VISIT…

LANZAROTE
Caliente.COM

Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам

II

Редактор
О. МИКЕШ

В 2-х частях

Перевод с английского
канд. техн. наук
А. Ю. КОШЕВНИКА,

канд. техн. наук.
Е. Л. СТЫСКИНА

под редакцией и с послесловием
доктора хим. наук, профессора
В. Г. БЕРЕЗКИНА

Москва · Мир · 1982

LABORATORY HANDBOOK OF

CHROMATOGRAPHIC AND ALLIED METHODS

Chief Editor: O. MIKEŠ
Czechoslovak Academy of Sciences, Prague

Contributors: M. Hejtmánek, R. Komers, M. Krejči, B. Meloun, O. Mikeš, O. Motl, J. Novák, L. Novotný, Ž. Procházka, Z. Prusik, K. Šebesta, J. Štamberg, V. Tomášek, J. Turková

Translator: Ž. PROCHAZKA
Czechoslovak Academy of Sciences, Prague

Translation Editor: R. A. CHALMERS
University of Aberdeen

ELLIS HORWOOD LIMITED PUBLISHER

Chichester
Halsted Press: a division of

John Wiley & Sons
Chichester · New York · Brisbane · Toronto

Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам

II

Редактор
О. МИКЕШ

В 2-х частях

Перевод с английского
канд. техн. наук
А. Ю. КОШЕВНИКА,

канд. техн. наук.
Е. Л. СТЫСКИНА

под редакцией и с послесловием
доктора хим. наук, профессора
В. Г. БЕРЕЗКИНА

Москва · Мир · 1982

ББК 24.4
Л.12
УДК 543

Авторы: **Я. Туркова, Б. Мелоун, О. Мотл, Л. Новотный, Р. Комерс, М. Крейчи, З. Прохазка, З. Прусик, О. Микеш**

Л 12 Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам: Пер. с англ./Под ред. О. Микеша. — М.: Мир, 1982. — Ч. II. 381 с., ил.

Книга написана чехословацкими специалистами, оригинальные исследования которых широко известны во всем мире. Это своего рода краткая энциклопедия по хроматографии. В ней рассматриваются все применяемые в настоящее время хроматографические методы анализа многокомпонентных смесей.

В русском издании книга выходит в двух частях.

Во второй части рассматриваются аффинная, тонкослойная и газовая хроматография, разделение противоточным и электромиграционным методами.

Для научных и инженерно-технических работников — химиков, биохимиков, медиков, биологов, фармацевтов.

Л $\frac{1805000000—048}{041(01)—82}$ 84—82, ч. 1

Редакция литературы по химии

© 1979 Otakar Mikeš/Ellis Horwood
© Перевод на русский язык, «Мир», 1982

Глава 7. Аффинная хроматография

Я. ТУРКОВА

Институт органической химии и биохимии,
Чехословацкая Академия наук, Прага

7.1. ВВЕДЕНИЕ

Одновременно с разработкой нерастворимых макропористых полимерных носителей происходило быстрое развитие аффинной хроматографии (называемой также биоаффинной или биоспецифической). Аффинная хроматография представляет собой особый метод, предназначенный для выделения биологически активных соединений. Метод основан на исключительном биологическом свойстве присоединять специфически и обратимо другие вещества, для которых Рейнер и Уэлч [78] ввели название «аффиннанты» или «аффинные лиганды». В настоящее время наиболее распространенным способом получения нерастворимых аффинных сорбентов является их присоединение к носителю путем образования ковалентных связей. Если раствор, содержащий биологически активное соединение, которое следует выделить, фильтруют через колонку, заполненную нерастворимым носителем, связанным с аффинным лигандом, то все соединения, не обладающие сродством к данному аффинному лиганду, беспрепятственно проходят через колонку, тогда как соединения, обладающие таким сродством, удерживаются в колонке, причем прочность их удерживания зависит от степени их сродства и конкретных экспериментальных условий. Специфически сорбированные соединения можно затем элюировать, применив либо растворимый аффичный лиганд, либо изменив состав растворителя с тем, чтобы вызвать диссоциацию специфического комплекса, как это показано на рис. 7.1 и 7.2. На обоих рисунках показано разделение методом аффинной хроматографии экстракта поджелудочной железы на колонке, заполненной агарозой со связанным ингибитором трипсина, проведенное Поратом и Сундбергером [75]. В щелочной среде химотрипсин и трипсин специфически сорбируются на колонке, а затем вымываются последовательно растворами специфических ингибиторов (рис. 7.1) или буферными растворами с градиентом pH (рис. 7.2).

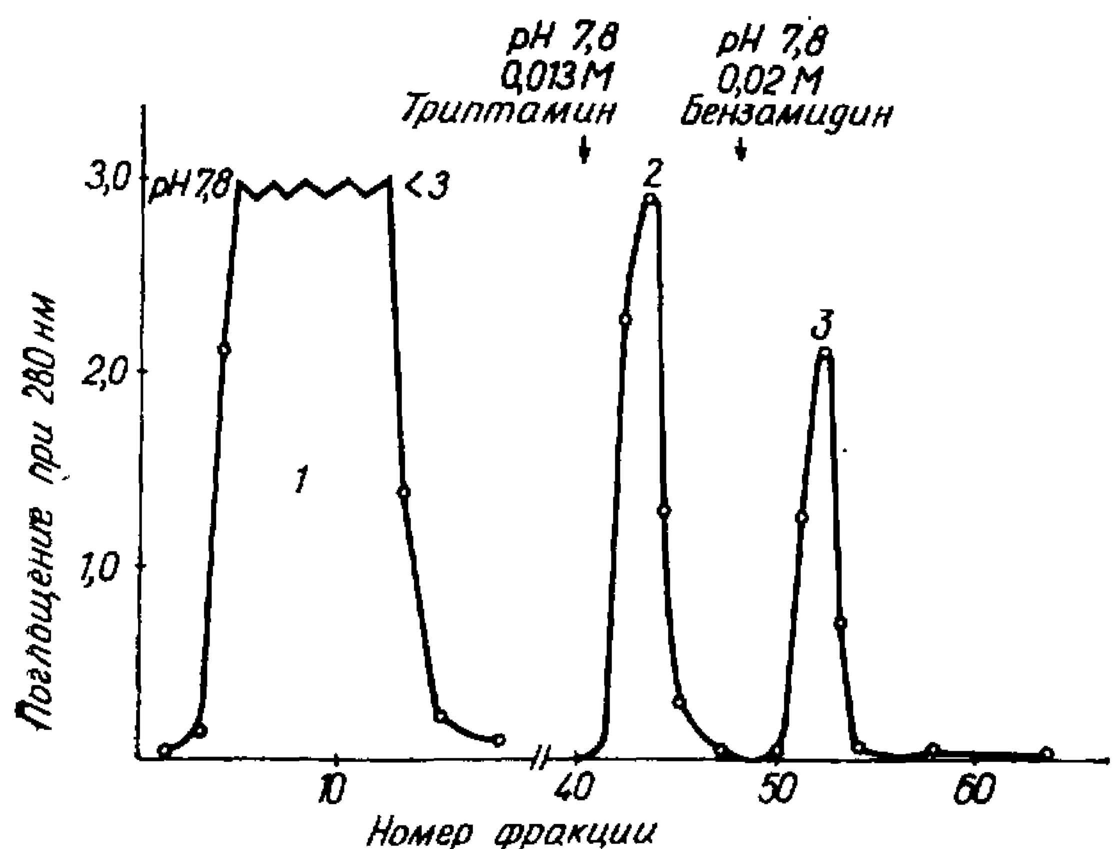


Рис. 7.1. Аффинная хроматография неочищенного экстракта поджелудочной железы с применением специфических ингибиторов [75].

Носитель — сефароза, связанная с ингибитором трипсина из соевых бобов; объем колонки 30 мл; ступенчатое элюирование растворами специфических ингибиторов химотрипсина CH (триптамин) и трипсина TR (бензамидин). *1* — экстракт поджелудочной железы; *2* — триптамин, pH 7,8; 0,013 M; *3* — бензамидин, pH 7,8; 0,02 M.

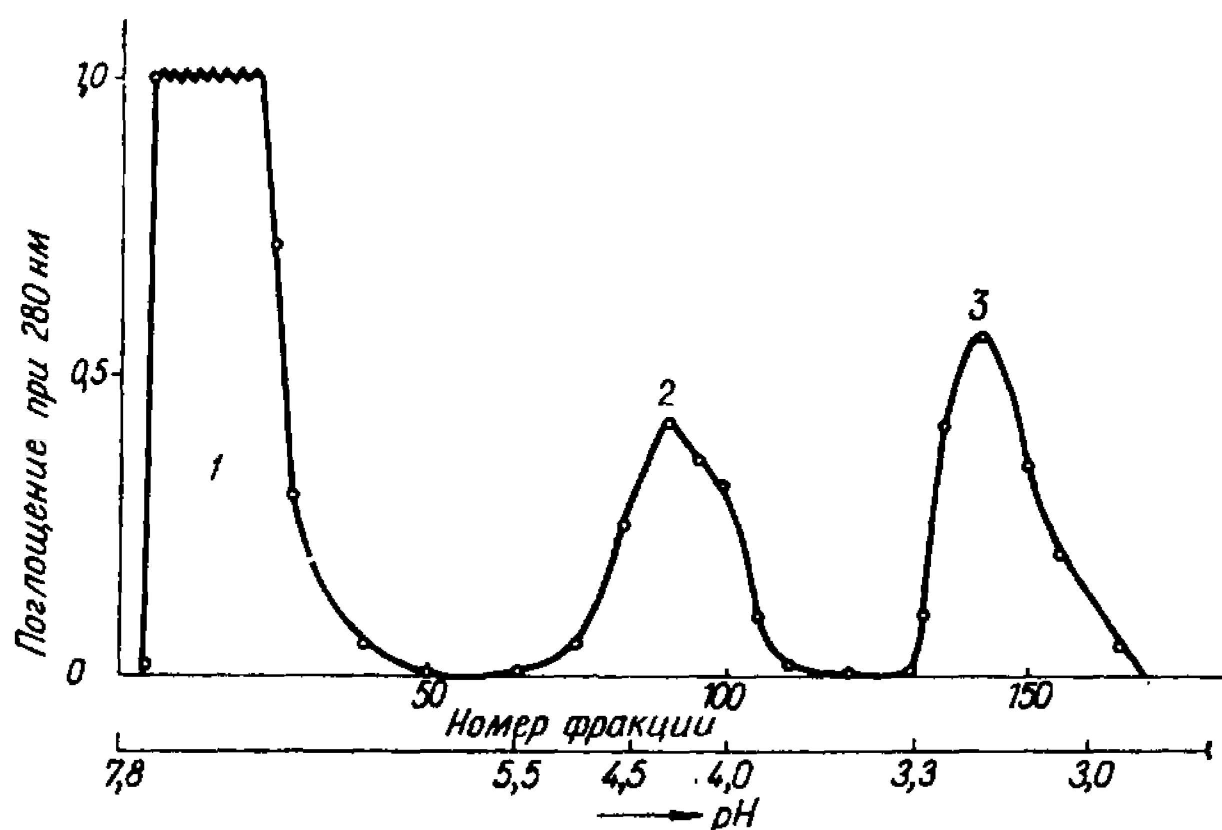


Рис. 7.2. Аффинная хроматография неочищенного экстракта поджелудочной железы при градиенте pH [75].

Условия разделения указаны в подписи к рис. 7.1. Обозначения те же, что и на рис. 7.1.

Принцип аффинной хроматографии известен уже более 20 лет*. В 1951 г. Кемпбелл и сотр. [7] использовали для выделения антител целлюлозу с ковалентно связанным антигеном, а в 1953 г. Лерман [53] применил этот принцип для выделения ферментов. В последующие годы тем не менее аффинная хроматография использовалась лишь изредка, по-видимому, из-за отсутствия пригодных носителей. Важную роль в развитии аффинной хроматографии сыграла разработка Аксеном, Поратом и Эрнбеком [4, 76] метода связывания аффинных лигандов с агарозой, активированной бромцианом. Как впоследствии показали Куатреказас и Энфинсен [15, 16], агароза относится к числу носителей, особенно удобных для аффинной хроматографии. Именно на агарозе в 1968 г. Куатреказас, Уилчек и Энфинсен [18] успешно разделили нуклеазу, химотрипсин и карбоксипептидазу. Эта работа сейчас хорошо известна, так как ее авторы первыми ввели термин «аффинная хроматография». Данные этого исследования способствовали быстрому развитию аффинной хроматографии, и после 1970 г. работы, посвященные этому виду хроматографии, публикуются уже регулярно. Аффинная хроматография применяется для выделения ферментов, при этом аффинными лигандами служат их ингибиторы, субстраты или кофакторы. Ковалентно связанные ферменты применяются для выделения их ингибиторов. Для выделения антител в качестве аффинных лигандов используются антигены, а для выделения антигенов — антитела. С помощью подходящих аффинных лигандов удается выделить нуклеиновые кислоты, транспортные и репрессорные белки, гормоны и их рецепторы, а также ряд других соединений. В этой главе мы приведем лишь несколько таких примеров. Более подробную информацию о применении аффинной хроматографии можно найти в обзорных статьях [26, 89].

Условия проведения аффинной хроматографии зависят от природы соединения, которое нужно выделить. Однако существует ряд общих требований, касающихся свойств нерастворимого носителя, выбора типа аффинного лиганда, его связывания с носителем, условий адсорбции и элюирования.

7.1.1. ВЫБОР НЕРАСТВОРИМОГО НОСИТЕЛЯ

Важным условием успешного проведения аффинной хроматографии является выбор подходящего нерастворимого носителя для получения сорбента. В обзорной статье Куатреказаса и

* Сорбционная иммобилизация аффинанта была впервые применена советским ученым В. А. Энгельгардтом [Biochem. Z., 148, 463 (1924)], исследовавшим специфические взаимодействия антиген — антитело. Он назвал этот принцип «методом фиксированного партнера».

Энфинсена [16] описываются свойства, которыми должен обладать идеальный носитель. Прежде всего он должен как можно меньше взаимодействовать с выделяемыми соединениями, так как необходимо исключить неспецифическую сорбцию. Этому требованию более всего отвечают выпускаемые рядом фирм нейтральные полимеры, например сефароза или биогель. С практической точки зрения важно, чтобы носитель обладал хорошими гидродинамическими свойствами (малым сопротивлением потоку жидкости) и сохранял эти свойства после присоединения аффинного лиганда. Для связывания аффинного лиганда необходимо наличие в носителе достаточного числа химических групп, которые можно активировать или модифицировать в условиях, не влияющих на структуру носителя или на связанный аффинный лиганд. Носитель должен оставаться прочным и химически устойчивым в процессе присоединения аффинных лигандов, а также при изменении pH, ионной силы и температуры и в присутствии денатурирующих агентов типа мочевины или гуанидинхлорида, которые могут оказаться необходимыми для адсорбции или элюирования выделяемого соединения. Прочность и химическая устойчивость особенно важны при повторном использовании этих специфических адсорбентов. Носители должны иметь пористую структуру, обеспечивающую свободную диффузию в поры даже крупных макромолекул. Частицы носителя должны быть сферическими, однородными по размеру и прочными. Важным условием для выделения соединений с большой молекулярной массой является высокая степень пористости носителя. Например, Стирс и сотр. [84] выделили β-галактозидазу из *Escherichia coli* методом аффинной хроматографии, применив в качестве лиганда-ингибитора *п*-аминофенил-β-D-тиогалактопиранозид, связанный углеводородной боковой цепью с сефарозой или с полиакриламидным гелем, биогелем 300. Сорбент на основе сефарозы обладал превосходными свойствами, в то время как на биогеле β-галактозидаза не сорбировалась, хотя с 1 мл геля было связано практически в тех же условиях 20 мкмоль ингибитора. Этим примером авторы показали, что, если с носителем связывается достаточное количество лиганда, это еще не означает, что полученный сорбент окажется достаточно специфичным и эффективным. Авторы предполагают, что в биогеле преобладающая доля молекул лиганда находится внутри частиц геля и поэтому недоступна для больших молекул активного тетрамера β-галактозидазы (мол. масса $5{,}4 \cdot 10^5$) [11]. В то же время авторы работы [14] с успехом применили биогель в качестве носителя для выделения нуклеазы из стафилококков (мол. масса $1{,}7 \cdot 10^4$). Высокая пористость нерастворимого носителя также обязательна для выделения соединений, обладающих относительно слабым сродством к связанному аффинному ли-

ганду (константа диссоциации $\geqslant 10^{-5}$). Концентрация аффинного лиганда, связанного с носителем и легко доступного для выделяемого соединения, должна быть очень высокой; только при этом условии соединение может задержаться в колонке.

7.1.2. ВЫБОР И СВЯЗЫВАНИЕ АФФИННОГО ЛИГАНДА

Правильный выбор подходящего аффинного лиганда и условий его связывания, дающих максимальную емкость, так же важны, как и выбор носителя.

В качестве аффинных лигандов можно использовать любые соединения, прочно, специфично и обратимо связывающиеся с выделяемым веществом. Химическое строение аффинных лигандов может быть самым различным. Поскольку в настоящее время метод аффинной хроматографии применяется главным образом для выделения ферментов и их ингибиторов [89], мы рассмотрим примеры, взятые из этой области. Как уже упоминалось, при выделении фермента аффинными лигандами могут служить его ингибитор, аналогичный субстрату, а также эффектор, кофактор и в отдельных случаях даже субстрат. Это справедливо и для фермента, требующего для реакции два субстрата, но способного достаточно сильно связываться только с одним из них. Субстрат также можно использовать для адсорбции фермента в таких условиях, когда фермент связывается, но сам не способен катализировать реакцию (например, в отсутствие ионов металлов, необходимых для реакции), а также когда константа Михаэлиса зависит от pH или температуры. Аффинный адсорбент для выделения белков обычно трудно получить из аффинного лиганда, если константа диссоциации его комплекса с белком превышает $(0{,}5—1{,}0)\cdot 10^{-3}$ [16]. Однако Стирс и сотр. [84] показали, что очень эффективный адсорбент для β-галактозидазы можно получить даже из такого относительно слабого ингибитора, как *п*-аминофенил-β-D-тиогалактопиранозид ($K_i \approx 5\cdot 10^{-3}$). Этого удается достигнуть, повышая концентрацию нерастворимого аффинного лиганда и увеличивая расстояние между аффинным лигандом и матрицей носителя, что приводит к максимальной доступности аффинного лиганда для белка в растворе*.

* О'Карра и сотр. [71а] позднее показали, что увеличение сорбционной активности обусловлено главным образом природой группировки, которой β-галактозидаза присоединена к носителю, а именно гидрофобными взаимодействиями. Адсорбент *B* (см. рис. 7.3) сохраняет сильное сродство к β-галактозидазе даже после замещения β-тиогалактозида неспецифическим α-глюкозидом или N-фенилглицином. Однако он теряет активность при замене присоединяющей группировки на полярную или гидрофильную. В аналогичных случаях, когда в связывающую способность адсорбента вносит вклад неспецифическая сорбция, авторы [71а] вводят термин «сродство к данному соединению».

На рис. 7.3 показаны способы связывания [14] вышеупомянутого ингибитора. *А* представляет собой адсорбент с ингибитором, непосредственно связанным с поверхностью матрицы, в *Б* ингибитор удален от матрицы на расстояние около 10 Å, а в *В* ингибитор находится в 20 Å от матрицы. В то время как сор-

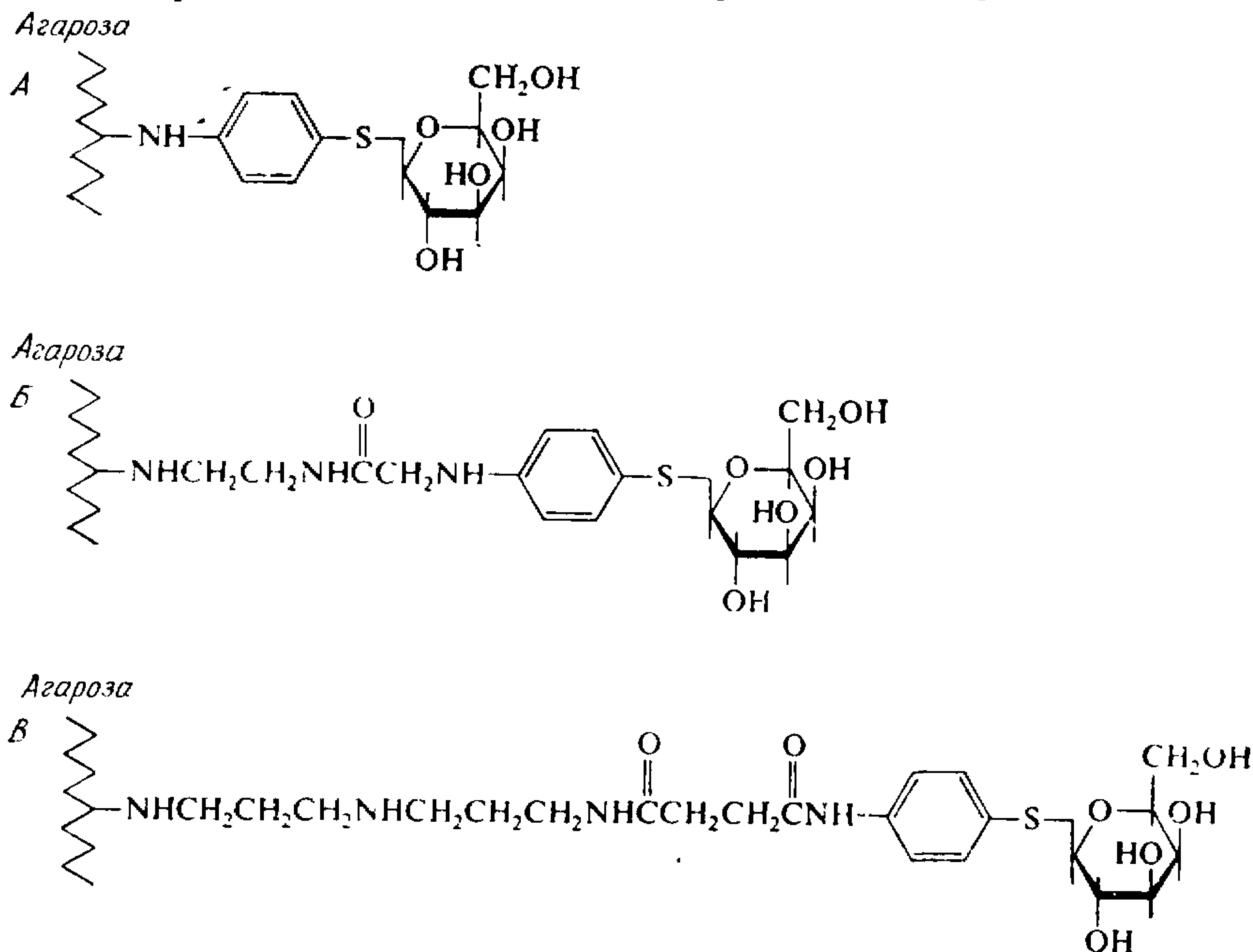


Рис. 7.3. Специфические адсорбенты для аффинной хроматографии бактериальной β-галактозидазы, полученные присоединением *п*-аминофенил-β-D-тиогалактопиранозида на различных расстояниях от поверхности твердого носителя [14].

А — адсорбент с ингибитором, связанным непосредственно с поверхностью матрицы; *Б* — адсорбент с ингибитором, удаленным от поверхности матрицы примерно на 10 Å; *В* — адсорбент с ингибитором, удаленным от поверхности матрицы на 20 Å. β-Галактозидаза адсорбируется сорбентом *В*, проявляющим к ней очень сильное сродство, слабо сорбируется *Б* и совсем не сорбируется *А*.

бент *В* обладает очень сильным сродством к β-галактозидазе, сорбент *Б* связывается с ней очень слабо, а сорбент *А* не связывается вообще. Увеличение расстояния между ингибитором и матрицей носителя приводит к тому, что этот носитель, даже смешанный с немодифицированной агарозой (т. е. при существенно более низкой концентрации аффинного лиганда), хорошо сохраняет свою способность к связыванию. Фермент можно элюировать из колонки с агарозой, содержащей небольшое количество аффинного лиганда, даже буферными растворами, со-

держащими субстрат, в то время как на колонках с высокой концентрацией ингибитора фермент связывается так прочно, что такие растворы его не вымывают. В этом случае β-галактозидаза сохраняет свою ферментативную активность и в связанном состоянии, на что указывает расщепление субстрата в процессе его прохождения через колонку. Более высокая концентрация связанного аффинного лиганда не обязательно приводит к улучшению адсорбционных свойств. Так, Аксен и Эрнбек [3], присоединяя химотрипсин к различным производным агарозы и сефадекса, показали, что отношение активности связанного и свободного фермента уменьшается с увеличением концентрации химотрипсина, связанного с носителем. Однако Кальдерон и сотр. [48] показали, что проблема состоит не только в экономичности использования связанного аффинного лиганда. Они обнаружили, что увеличение концентрации связанного ингибитора, [N(ε-аминокапронил)-*п*-аминофенил]триметиламмоний-бромида, выше 0,16 мкмоль на 1 мл носителя приводит к уменьшению специфичности сорбции ацетилхолинэстеразы. Этот эффект может быть обусловлен неспецифическим связыванием с адсорбентом, вызванным ионообменными свойствами последнего. Способность к ионному обмену проявляется у сорбента в результате увеличения содержания аммонийных групп. Чтобы уменьшить неспецифическую сорбцию, авторы увеличили ионную силу раствора при связывании фермента. Однако этот метод оказался непригодным, так как наблюдалось значительное уменьшение сродства фермента к ингибитору.

Если в качестве аффинного лиганда используется кофактор, согласно данным Лоу и Дина [57], очень важно, чтобы нативная конформация кофактора сохранялась даже после его связывания. Это справедливо также в том случае, если аффинным лигандом является биологически активный белок. Он должен быть присоединен к носителю минимально возможным числом связей, так как при этом увеличивается вероятность сохранения нативной третичной структуры белка. В качестве примера приведем работу Куатреказаса по выделению инсулина [14] на колонке с сефарозой с присоединенными при pH 6,5 или 9,5 антителами к свиному инсулину. Как будет показано ниже, белок связывается с активированной бромцианом сефарозой посредством непротонированных аминогрупп. Снижение pH уменьшает число связавшихся групп. Различия в величинах pH в процессе присоединения приводят к тому, что первое производное (pH 6,5) характеризуется почти 80%-ной теоретически возможной емкостью по инсулину, в то время как у второго производного (pH 9,5) эта емкость равна только 7%. Поскольку общее содержание белка одинаково в обоих случаях, второе производное должно содержать иммуноглобулин, который не способен

эффективно связывать антиген. Даже при низких pH можно получить адсорбент, который содержит большое количество активного белка, связанного с сефарозой, если увеличить количество бромциана во время активации и количество белка в процессе связывания [14].

Для успешного проведения аффинной хроматографии необходимо не только связывание аффинного лиганда, но и полное удаление всего аффинного лиганда, нековалентно связанного с носителем. Поэтому соединения следует тщательно промывать, контролируя результаты промывки. Сорбированные ароматические соединения можно успешно удалить с помощью органических растворителей, а для удаления белков полезна промывка денатурирующими агентами, если они не влияют на носитель и на связывающую способность аффинного лиганда. Необходимо быть уверенным в том, что измеряемая биологическая активность специфического адсорбента действительно обусловлена только ковалентно связанным аффинным лигандом. С этой целью определяют изменение концентрации нерастворимого производного после инкубирования в различных буферных растворах или после других подходящих обработок сорбента.

Количество связанного лиганда определяется в зависимости от его природы с помощью методов, основанных, как правило, на освобождении аффинного лиганда в результате щелочного или кислотного гидролиза. Анализируя пептиды, удобнее всего определять количество аминокислот после кислотного гидролиза [3]. При использовании радиоактивного лиганда целесообразно проводить измерение радиоактивности. Концентрацию связанного аффинного лиганда удобнее выражать числом микромолей этого лиганда, приходящимся на 1 мл набухшего в колонке геля, а не на 1 г сухого носителя.

7.1.3. УСЛОВИЯ СОРБЦИИ И ЭЛЮИРОВАНИЯ

Условия адсорбции и элюирования выделяемого соединения зависят от его специфических свойств. Если нужно выделить небольшое количество белка из неочищенной смеси с помощью аффинного лиганда, обладающего высоким сродством, то иногда сочетают обработку в стационарных условиях с элюированием после переноса сорбента в колонку [16]. Если же соединение, которое необходимо выделить, обладает незначительным сродством к специфическому адсорбенту, оно очень часто элюируется из колонки даже без смены буферного раствора. В этом случае получают разбавленный раствор этого соединения. При выделении высокомолекулярных соединений скорость потока жидкости, проходящего через колонку, должна быть достаточно низкой. На адсорбционное равновесие влияет не только число

столкновений между молекулами выделяемого соединения и аффинного лиганда, но и взаимная ориентация участков связывания. Например, выделение нуклеазы из стафилококков Куатреказас и сотр. [18] рекомендуют вести при скорости потока 70 мл/ч на колонках с сефарозой (0,8×5 см) при K_i, равном 10^{-6}. Адсорбированные соединения элюируют главным образом, меняя pH, ионную силу раствора или температуру, а если элюируются ферменты, то растворами ингибитора или субстрата [16]. Если аффинный лиганд связан с матрицей азогруппами тиолсложноэфирной или сложноэфирной связью, то аффинный комплекс лиганд — вещество можно отщепить от нерастворимой матрицы и далее отделить лиганд диализом или гель-фильтрацией. Однако при этом естественно, исключается возможность повторного использования аффинной матрицы (см. [14]).

7.2. НЕРАСТВОРИМЫЕ НОСИТЕЛИ ДЛЯ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

7.2.1. ПОЛИДЕКСТРАНОВЫЕ НОСИТЕЛИ И ИХ ПРОИЗВОДНЫЕ

ОБЗОР ПРОИЗВОДНЫХ И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА

Из перечня носителей, приведенного в разд. 7.3, следует, что наиболее часто используются для аффинной хроматографии агароза и ее производные. Хорошо известны промышленные препараты сефароза и биогель А. Сефароза — промышленное название сферического геля агарозы, выпускаемого фирмой Pharmacia Fine Chemicals AB (Швеция). Сефароза продается в набухшем состоянии, суспендированная в дистиллированной воде, содержащей 0,02% азида натрия в качестве бактериостатического агента.

В настоящее время доступны три типа: сефароза 6B с концентрацией агарозы ~6% (размер набухших гранул 40—210 мкм), предназначенная для фракционирования соединений с мол. массой 10^5—10^6; сефароза 4B с концентрацией агарозы ~4% (размер набухших гранул 40—190 мкм), предназначенная для фракционирования соединений с мол. массой $3\cdot10^5$—$3\cdot10^6$; сефароза 2B с 2%-ной концентрацией агарозы (размер набухших гранул 60—250 мкм), используемая для фракционирования соединений с мол. массой $2\cdot10^6$—$25\cdot10^6$. Для аффинной хроматографии наиболее широко применяется сефароза 4B, в то время как с помощью сефарозы 2B в основном проводится выделение особенно больших молекул.

Биогель А — промышленное название агарозы, которую производит фирма Bio-Rad (Ричмонд, Калифорния). Выпускаются следующие типы биогеля А:

	Содержание агарозы, %	Исключаемая молекулярная масса
Биогель А-0,5m	10	$0,5\cdot 10^6$
Биогель А-1,5m	8	$1,5\cdot 10^6$
Биогель А-5m	6	$5\cdot 10^6$
Биогель А-15m	4	$15\cdot 10^6$
Биогель А-50m	2	$50\cdot 10^6$
Биогель А-150m	1	$150\cdot 10^6$

Все эти гели поставляются в виде гранул трех размеров: 50—100 меш (149—290 мкм), 100—200 меш (74—149 мкм) и 200—400 меш (38—74 мкм). Они поставляются в набухшем состоянии в виде суспензии, содержащей 0,02% азида натрия и 0,001 М трис-буфера [трис(оксиметил)аминометана] и EDTA (этилендиаминтетрауксусной кислоты).

ХИМИЯ СВЯЗЫВАНИЯ

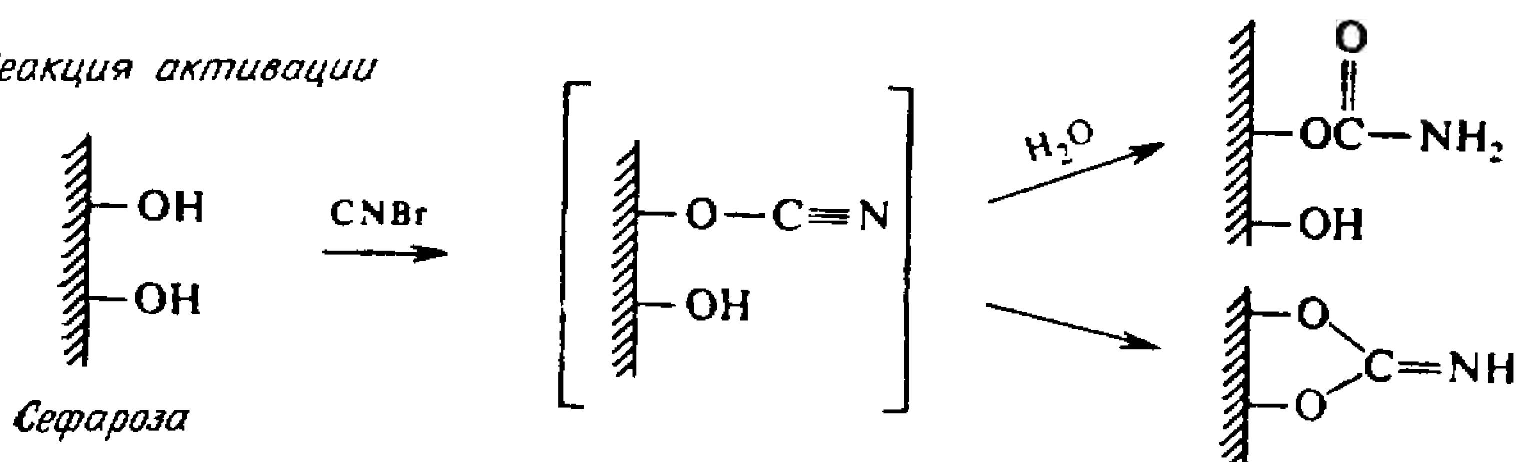
Чаще всего связывание аффинного лиганда с агарозой проводят по методу, разработанному Аксеном, Поратом и Эрнбеком [4, 76]. После химической активации бромцианом в щелочной среде агароза ковалентно связывает соединения, содержащие первичные алифатические или ароматические аминогруппы. Степень активации, измеряемая по способности к связыванию небольших пептидов, пропорциональна значению pH в процессе активации [3], т. е. она растет с увеличением pH. Аксен и Эрнбек [3] предложили возможную схему процесса активации.

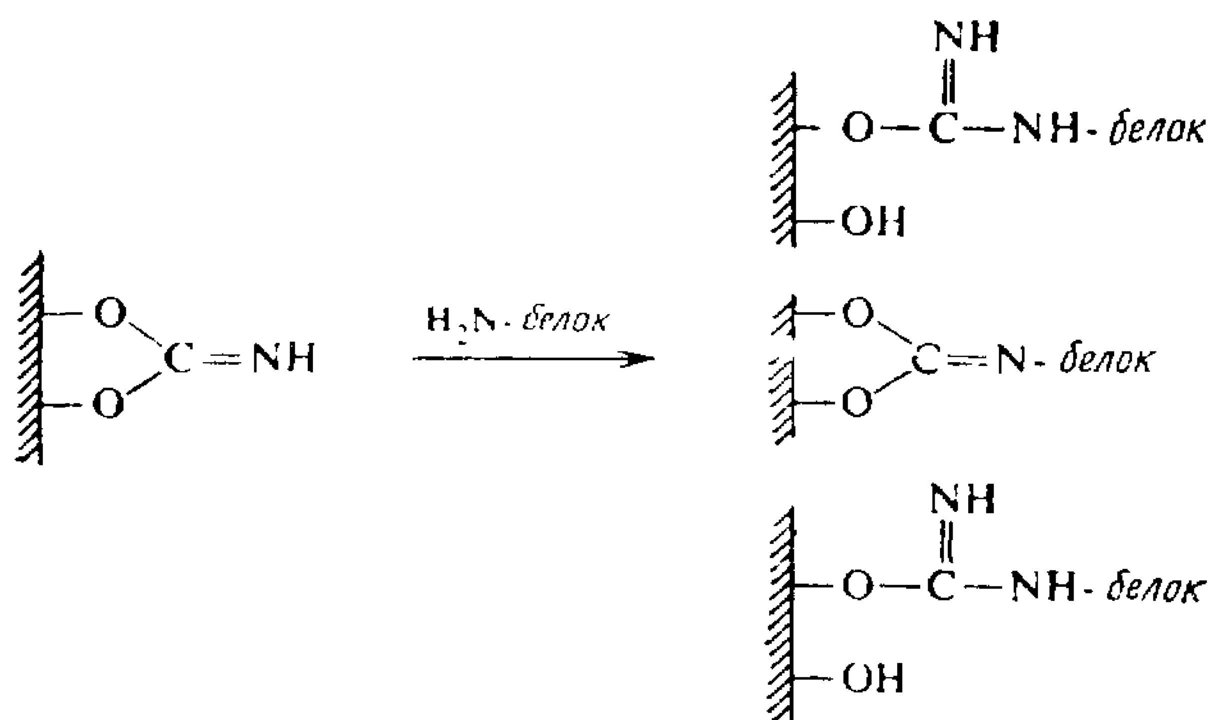
Авторы постулируют двухстадийную реакцию. На первой стадии в качестве лабильного промежуточного соединения образуется цианат. Он дает сначала инертный карбамат, а затем активный имидокарбонат, к которому в слабощелочной среде и присоединяется аминогруппа с образованием ковалентной связи между белком и носителем. Однако, согласно литературным данным, этот механизм является спорным, так как вицинальные гидроксильные группы сефарозы не способны к образованию пятичленного имидокарбонатного цикла. Тем не менее возможно, что изменения могут происходить во время процесса стабилизации. Если исходить из результатов изучения модельных реакций с метил-4,6-О-бензилиден-α-D-глюкопиранозидом [1], то наиболее вероятно, что связывание аффинного лиганда с носителем осуществляется главным образом через производные изомочевины.

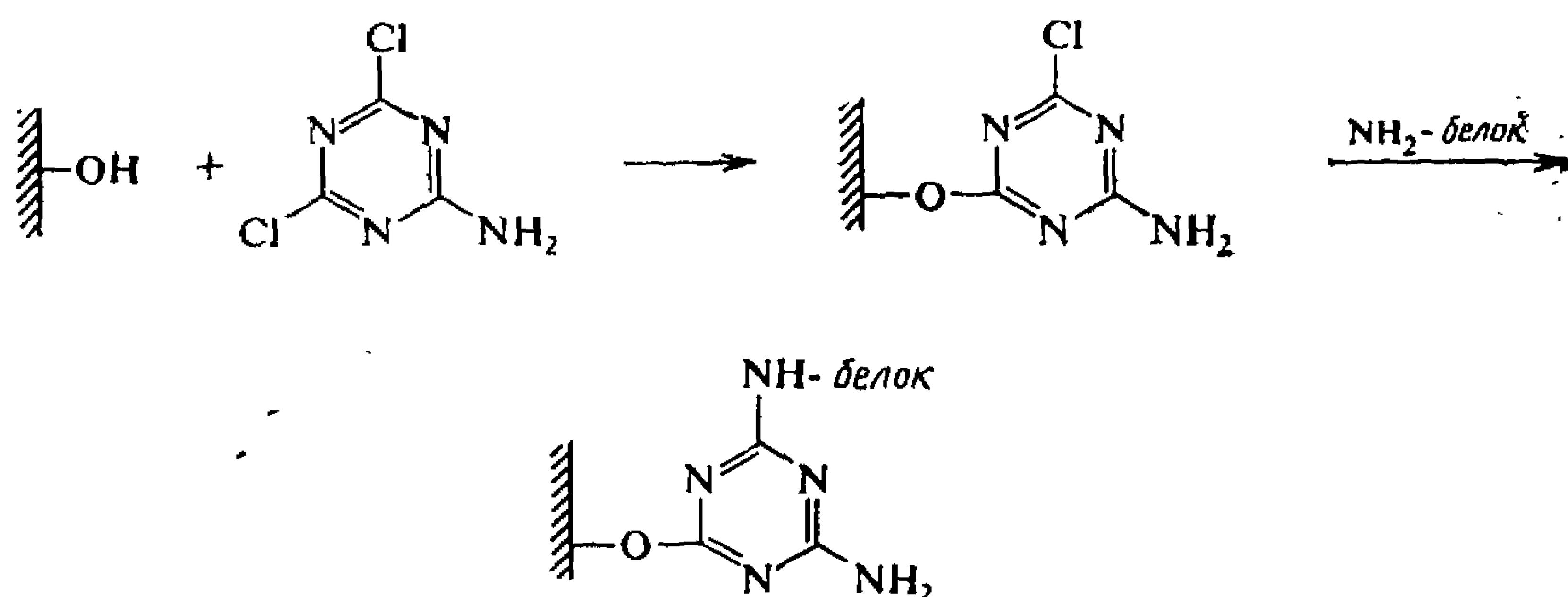
Если амины связываются с сефарозой, активированной бромцианом, то при этом, как показали Уилчек и сотр. [103а], образуются положительно заряженные группировки N-замещенной изомочевины, которые могут далее реагировать с аминами, об-

разуя N_1,N_2-дизамещенные гуанидины. Сорбенты, в которые после активации бромцианом встраиваются алкиламинные группы, обладают ионообменными свойствами. Кроме того, наличие положительно заряженных групп в комбинации с гидрофобными пространственными группами (спейсеров) приводит к появлению у сорбентов детергентных свойств, в результате этого усиливается тенденция к неспецифической сорбции и в ряде случаев становится возможной даже инактивация фермента [102а]. В присутствии соединений, содержащих нуклеофильные группы, которые расщепляют связи изомочевины, может происходить освобождение аффинных лигандов из сорбентов. Такое освобождение лигандов особенно опасно в системах с высоким сродством или при выделении малых количеств вещества.

Второй из наиболее употребительных методов связывания белков с агарозой — это триазиновый метод Кея и Лилли [50], первоначально разработанный для присоединения белков к ОН-группам целлюлозы [49]. Гидроксильная группа носителя связывается с 2-амино-4,6-дихлор-*симм*-триазином, который далее взаимодействует с NH_2-группой белка:







УСТОЙЧИВОСТЬ АГАРОЗНЫХ ГЕЛЕЙ И РАБОТА С НИМИ

Считается, что сефароза устойчива в области pH 4—9; с ней не рекомендуется работать при температурах ниже 0 °С или выше 40 °С. Сефароза устойчива к действию концентрированных растворов солей или мочевины. Куатреказас [14] указывает, что на частицы агарозы существенно не влияет продолжительное воздействие 6М раствора гуанидинхлорида или 7М раствора мочевины. Поэтому агарозные аффинные сорбенты можно отмывать от белков этими денатурирующими растворами. В течение 2—3 ч при комнатной температуре на агарозу не действуют 0,1М гидроксид натрия или 1М хлорная кислота. Ни 50%-ный (по объему) водный диметилформамид, ни 50%-ный (по объему) водный этиленгликоль не меняют структуру агарозы. Эти растворители полезны при аффинной хроматографии относительно плохо растворимых в воде соединений, например тироксина и стероидов. Аффинные сорбенты на основе сефарозы можно хранить при 4° С в виде водной суспензии с добавкой антибактериального агента. Длительность хранения определяется лишь стабильностью связанного аффинного лиганда. Однако агарозные аффинные сорбенты полностью разрушаются при высушивании или замораживании. Согласно данным Аксена и Эрнбека [3], эти сорбенты можно лиофилизовать, если добавить к ним декстран, глюкозу и сывороточный альбумин. Химическая стабильность биогеля А такая же, как у сефарозы.

7.2.2. МЕТОДИКИ СВЯЗЫВАНИЯ АФФИНАНТА С АГАРОЗОЙ И ЕЕ МОДИФИКАЦИЯМИ

СВЯЗЫВАНИЕ АФФИННОГО ЛИГАНДА С СЕФАРОЗОЙ, АКТИВИРОВАННОЙ БРОМЦИАНОМ

Метод связывания аффинантного лиганда с сефарозой, активированной бромцианом, разработан Аксеном, Поратом и Эрнбеком [4, 76]; Куатреказас дополнил его на основе собственных данных [14].

Отмытую и декантированную сефарозу суспендируют в дистиллированной воде (1 : 1). Работу ведут под тягой. В суспензию сефарозы погружают электроды рН-метра и при постоянном перемешивании прибавляют к ней небольшими порциями бромциан (50—300 мг на 1 мл набухшей сефарозы). Добавляя раствор гидроксида натрия, рН суспензии поддерживают примерно около 11. Для 5—10 мл сефарозы и 1—3 г бромциана рекомендуется 2*М* раствор гидроксида натрия, для 100—200 мл сефарозы и 20—30 г бромциана — 8*М* его раствор. Температура должна быть равна примерно 20 °С; если необходимо охлаждение, добавляют лед. Реакция заканчивается через 8—12 мин. Далее Куатреказас рекомендует добавить большое количество льда и быстро перенести суспензию в воронку Бюхнера. Активированную сефарозу промывают при постоянном отсасывании предварительно охлажденным буферным раствором того же состава, который используют при последующем связывании аффинного лиганда. Объем буферного раствора, расходуемый на промывку сефарозы, должен в 10—15 раз превышать объем раствора, в котором проводилась активация сефарозы. Промытую сефарозу как можно быстрее суспендируют в равном объеме раствора аффинного лиганда. Связывание ведут при постоянном перемешивании при пониженной температуре (4 °С) в течение 16—20 ч. Согласно данным Куатреказаса [14], промывка, добавление раствора аффинного лиганда и смешивание не должны длиться более 90 с. Даже при пониженной температуре активированная сефароза неустойчива. Связывание аффинного лиганда с активированной бромцианом сефарозой более подробно рассматривается в последующих разделах.

ТРИАЗИНОВЫЙ МЕТОД СВЯЗЫВАНИЯ АФФИНАНТА С АГАРОЗОЙ

Кей и Лилли [50] исследовали ряд триазиновых производных и разработали метод, который, как будет показано ниже, используется фирмой Miles-Seravac для получения ряда агарозных аффинных сорбентов.

Наиболее подходящим производным для связывания лигандов является 2-амино-4,6-дихлор-*симм*-триазин. Для получения полимерного аминохлор-*симм*-триазинилпроизводного необходимы два раствора. Раствор *А* получают, растворяя 10 г 2-амино-4,6-дихлор-*симм*-триазина в 250 мл ацетона при 50 °С и добавляя 250 мл воды при той же температуре. Раствор *Б* представляет собой 15%-ный (масса/объем) водный раствор карбоната натрия, к которому добавляют 0,6-кратный объем 1*М* соляной кислоты. Сефарозу 4В (125 мл; 2,5 г сухой массы) отмывают на воронке Бюхнера водой от защищающих веществ; уплот-

ненную сефарозу прибавляют к 100 мл раствора *А* и перемешивают 5 мин при 50 °С. После добавления раствора *Б* (40 мл) смесь перемешивают еще 5 мин при 50 °С. Затем, чтобы быстро снизить pH суспензии до pH<7, приливают концентрированную соляную кислоту. Продукт фильтруют при отсасывании и промывают последовательно смесью ацетон — вода (1 : 1 по объему) и водой. Продукт можно хранить при 2 °С в 0,1M фосфатном буфере, pH 6,7.

В качестве примера связывания аффинного лиганда рассмотрим получение нерастворимого производного химотрипсина [50]. Раствор (140 мл) химотрипсина (20 мг/мл) и 60 мл 0,5M боратного буфера (pH 8,7) прибавляют к 100 мл аминохлор-*симм*-триазинового производного сефарозы и выдерживают смесь 18 ч при постоянном перемешивании при 23 °С. Продукт промывают смесью 5M хлорида натрия и 8M мочевины (1 : 1 по объему). Изучение зависимости количества связанного химотрипсина от концентрации фермента показало, что при концентрации химотрипсина 4 мг на 1 мл реакционной смеси с сефарозой связывается более 60% химотрипсина, а при концентрации 8 мг/мл количество связанного белка превышает 70%. В отдельных экспериментах концентрация боратного буфера в реакционной смеси менялась в пределах 0,07—0,2M.

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ АГАРОЗЫ

Получение ω-аминоалкильных производных агарозы. Во вводной части главы уже говорилось, какую важную роль может играть углеводородная цепь, расположенная между аффинным лигандом и нерастворимым носителем. Алифатические диамины, например этилендиамин, можно непосредственно связывать с активированной бромцианом сефарозой. Для того чтобы избежать нежелательного образования дополнительных сшивок в результате реакции обеих концевых аминогрупп, используется большой избыток диамина. В соответствии с методикой Куатреказаса [14] суспензию сефарозы 4В в воде (1 : 1) обрабатывают бромцианом (250 мг на 1 мл сефарозы); условия проведения реакции описаны в предыдущем разделе. Равный объем холодной дистиллированной воды, содержащей 2 ммоль этилендиамина на 1 мл сефарозы, добавляют к промытой и собранной активированной сефарозе, pH которой доведен 6M соляной кислотой до 10. Смесь выдерживают 16 ч при 4 °С, после чего гель промывают большим объемом дистиллированной воды. Таким образом получают производные сефарозы, содержащие около 12 мкмоль аминоэтильных групп на 1 мл сефарозы. Используя различные диаминосоединения общей формулы $NH_2(CH_2)_xNH_2$, можно получить ряд ω-аминоалкильных производных сефарозы.

Связывание аффинного лиганда со свободной карбоксильной группой с аминоэтилагарозой. Аффинные лиганды, содержащие свободные карбоксильные группы, можно непосредственно связать с ω-аминоалкил-сефарозой с помощью водорастворимого карбодиимида.

В качестве примера рассмотрим получение эстрадиол-сефарозы [14]. 3-О-Сукцинил-^{3}Н-эстрадиол (300 мг), растворенный в 400 мл диметилформамида, добавляют к 40 мл уплотненной аминоэтил-сефарозы 4В. Применение диметилформамида необходимо для растворения эстрадиола, но в случае водорастворимых лигандов добавлять его не обязательно. pH суспензии поддерживают примерно около 4,7, добавляя соляную кислоту. 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (500 мг), растворенный в 3 мл воды, прибавляют к суспензии в течение 5 мин. Реакцию ведут 20 ч при комнатной температуре. Замещенную сефарозу переносят в колонку и промывают 50%-ным водным раствором диметилформамида до исчезновения радиоактивности в элюате. Продукт промывают 5—8 дней примерно 10 л раствора. С 1 мл сефарозы ковалентно связывается 0,5 мкмоль эстрадиола.

Обрабатывая аминоэтил-сефарозу О-бромацетил-N-оксисукцинимидом, Куатреказас [14] получил бромацетиламидоэтил-сефарозу, а при действии сукцинового ангидрида — сукциниламидоэтил-сефарозу. Производные диазония, способные сочетаться с фенольными и гистидиновыми соединениями, были получены из *п*-аминобензамидоэтил-сефарозы, которая в свою очередь была получена из аминоэтил-сефарозы. Аналогичным образом Куатреказас синтезировал тирозил-сефарозу для сочетания с соединениями диазония. Сульфгидрил-агарозу получают из ω-аминоалкилагарозы в результате реакции с тиолактонами гомоцистеина. Аффинные лиганды со свободными карбоксильными группами связывают с сульфгидрил-сефарозой тиолсложноэфирными связями с помощью водорастворимых карбодиимидов.

ПРОМЫШЛЕННЫЕ РЕАГЕНТЫ — CNBr-АКТИВИРОВАННАЯ СЕФАРОЗА 4В, АН-СЕФАРОЗА 4В и СН-СЕФАРОЗА 4В

Для упрощения методики присоединения аффинного лиганда к сефарозе 4В фирма Pharmacia Fine Chemicals AB (Упсала, Швеция) выпускает лиофилизованную CNBr-активированную сефарозу 4В. Для защиты геля в процессе лиофилизации к нему добавлены декстран и лактоза, которые можно отмыть перед использованием. Фирма приводит следующую методику связывания с CNBr-активированной сефарозой. Требуемое количество геля выдерживают до набухания в 10^{-3} М соляной кислоте,

далее гель промывают 15 мин этим же раствором. Объем 1 г лиофилизованного геля после набухания достигает 3,5 мл. В процессе промывки рекомендуется на 1 г сухого геля расходовать 200 мл раствора в виде нескольких порций. Непосредственно после промывки к гелю добавляют раствор аффинного лиганда.

Оптимальные условия связывания, pH, состав буферного раствора и температура, в значительной степени зависят от характера аффинного лиганда. Наиболее эффективно реакция проходит при pH 8—10, однако, если этого требует природа аффинного лиганда, можно использовать и более низкие значения pH. Аффинный лиганд, особенно белковой природы, растворяют в буфере с высокой ионной силой (около 0,5), чтобы предотвратить неспецифическую сорбцию, например белка на белке, которая обусловлена полиэлектролитной природой белков. Для последующей отмывки сорбента используются растворы с более высокой ионной силой. Можно применять карбонатные или боратные буферы с добавкой хлорида натрия. Количество присоединенного лиганда зависит от соотношения в реакционной смеси аффинного лиганда и объема геля, pH, природы самого лиганда (числа реакционноспособных групп и т. д.), а также от длительности проведения реакции и температуры. Например, при иммобилизации химотрипсина к 2 мл CNBr-активированной сефарозы при pH 8 присоединяется только 5 мг из 10 мг взятого белка, из 20 мг белка связывается примерно 8 мг, а из 30 мг — примерно 10 мг. При комнатной температуре (20—25 °C) связывание обычно завершается за 2 ч, при пониженной температуре рекомендуется увеличить длительность реакции до 16 ч, т. е. оставлять реакционную смесь на ночь. В процессе связывания реакционную массу необходимо перемешивать, но применять магнитную мешалку не рекомендуется, так как при таком перемешивании можно разрушить гель. Лучше всего перемешивать реакционную смесь встряхиванием. Когда реакция закончится, гель переносят на пористый стеклянный фильтр и промывают тем же буферным раствором, в котором проводилось связывание. Оставшиеся активные группы рекомендуется блокировать, с этой целью гель обрабатывают 2 ч 1М этаноламином при pH 8. Конечный продукт следует промыть 4—5 раз буферным раствором с высоким или низким pH. Например, можно использовать ацетатный (0,1 М, pH 4) или боратный буферный (0,1 М, pH 8,5) раствор, содержащий 1 моль/л хлорида натрия. Как уже упоминалось во введении, все нековалентно связанные соединения следует отмыть.

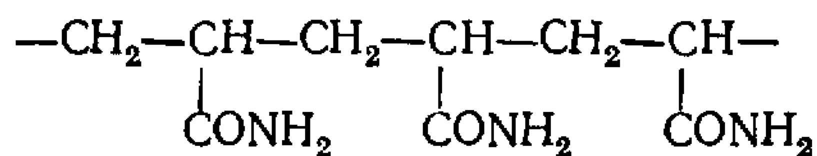
В настоящее время фирма Pharmacia выпускает новые носители для аффинной хроматографии — АН-сефарозу 4B, т. е. сефарозу с ковалентно связанным с помощью CNBr 1,6-диаминогекса-

ном, а также CH-сефарозу 4B, содержащую ковалентно связанную 6-аминогексановую кислоту. К этим носителям с помощью водорастворимых карбодиимидов можно легко присоединить аффинные лиганды через их свободные аминные или карбоксильные группы. Количество связанного 1,6-диаминогексана составляет 6—10 мкмоль на 1 мл набухшей AH-сефарозы. Количество связанной 6-аминогексановой кислоты достигает 10—14 мкмоль на 1 мл набухшей CH-сефарозы. Гели поставляются в виде лиофилизованных порошков, содержащих в качестве стабилизующих добавок лактозу и декстран. Гели устойчивы в течение 18 мес, если их хранят при 8 °C.

7.2.3. ПОЛИАКРИЛАМИДНЫЙ И ОКСИАКРИЛМЕТАКРИЛАТНЫЙ ГЕЛИ

ПОЛИАКРИЛАМИДНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ

Полиакриламидные гели — это гидрофильные сополимеры на основе акриламида и его производных. К углеводородному скелету этих гелей присоединены амидные группы:



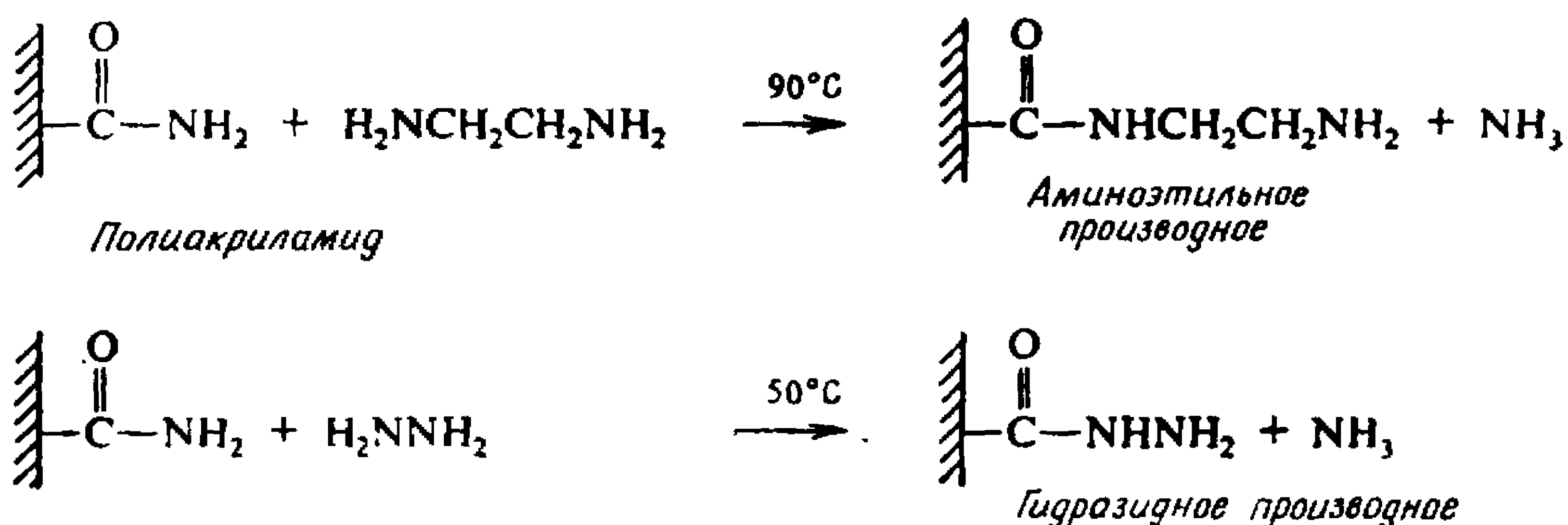
Как будет показано далее, воздействуя на полиакриламидные гели определенными соединениями, можно получить нерастворимые носители, пригодные для связывания ряда аффинных лигандов. Гели не содержат заряженных групп, и их ионообменная емкость ниже 0,05 мкэкв./г безводного вещества. Следовательно, ионный обмен с хроматографируемыми соединениями незначителен. Полиакриламидные гели биологически инертны. Поскольку эти гели представляют собой синтетические полимеры, микроорганизмы их не атакуют. Наиболее известная фирма, выпускающая полиакриламидные гели. — Bio-Rad Laboratories (Ричмонд, Калифорния, США). Под названием «биогель Р» выпускаются гели правильной сферической формы с различным размером частиц и пор. Эти гели получают сополимеризацией акриламида и N,N′-метиленбисакриламида (см. табл. 6.3, гл. 6). Для аффинной хроматографии используют биогели Р-300 (предел исключения $4 \cdot 10^5$) и Р-100 (предел исключения $1 \cdot 10^5$), а также слабокислотный катионообменник биогель СМ-100. Фирма Bio-Rad производит аминоэтильные и гидразидные производные биогелей Р-2 и Р-60 для синтеза сорбентов, предназначенных для аффинной хроматографии. Исходя из пределов исключения биогелей Р-2 и Р-60 (1800 и $6 \cdot 10^4$), можно пола-

гать, что в аффинной хроматографии больших молекул участвуют только группы, расположенные на поверхности частиц геля.

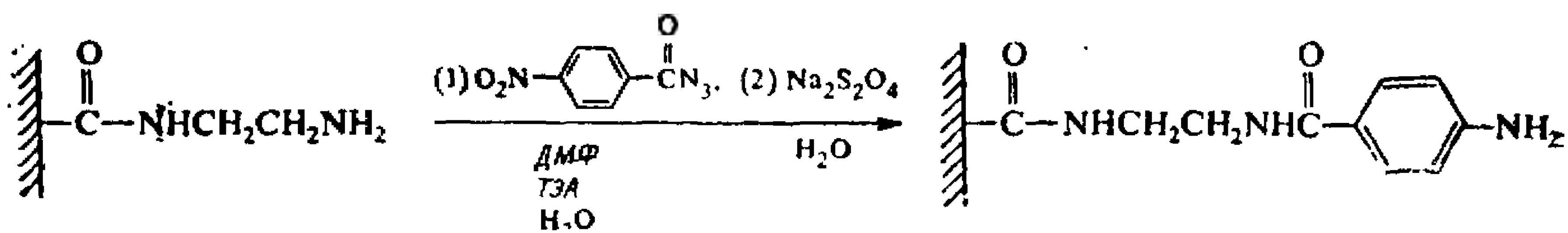
Фирма Koch-Light Laboratories Ltd. (Лондон, Англия) выпускает полиакриламидные гели под названием «энзакрил». Как будет показано ниже, эти акриламидные гели содержат различные функциональные группы, к которым можно присоединять различные аффинные лиганды.

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ АКРИЛАМИДНЫХ ГЕЛЕЙ И ПРИСОЕДИНЕНИЯ К НИМ АФФИННЫХ ЛИГАНДОВ

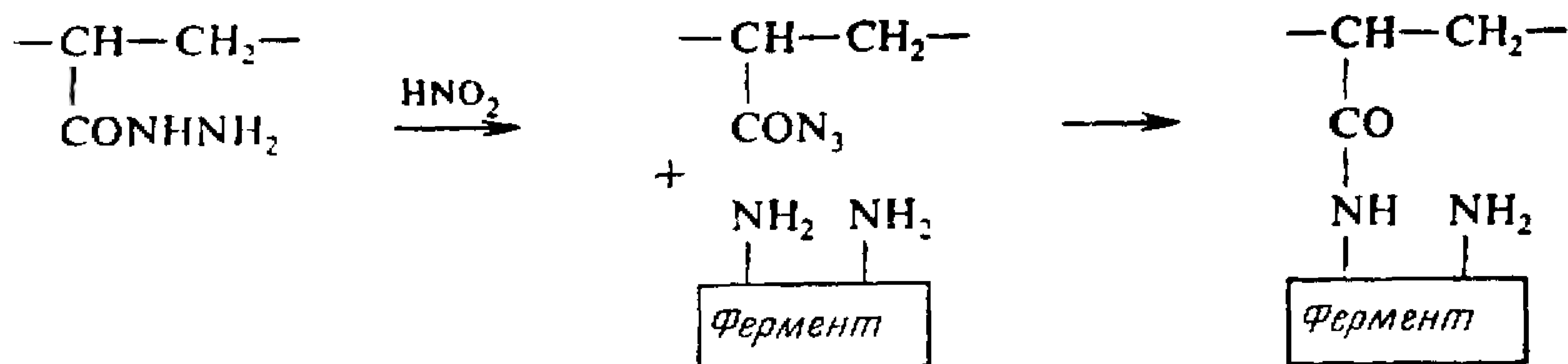
В разработку методов получения производных акриламидного геля наибольший вклад внесли Инман и Динцис [46]. Аминоэтильные и гидразидные производные полиакриламидных гелей можно получать, обрабатывая гели большим избытком этилендиамина или гидразина.



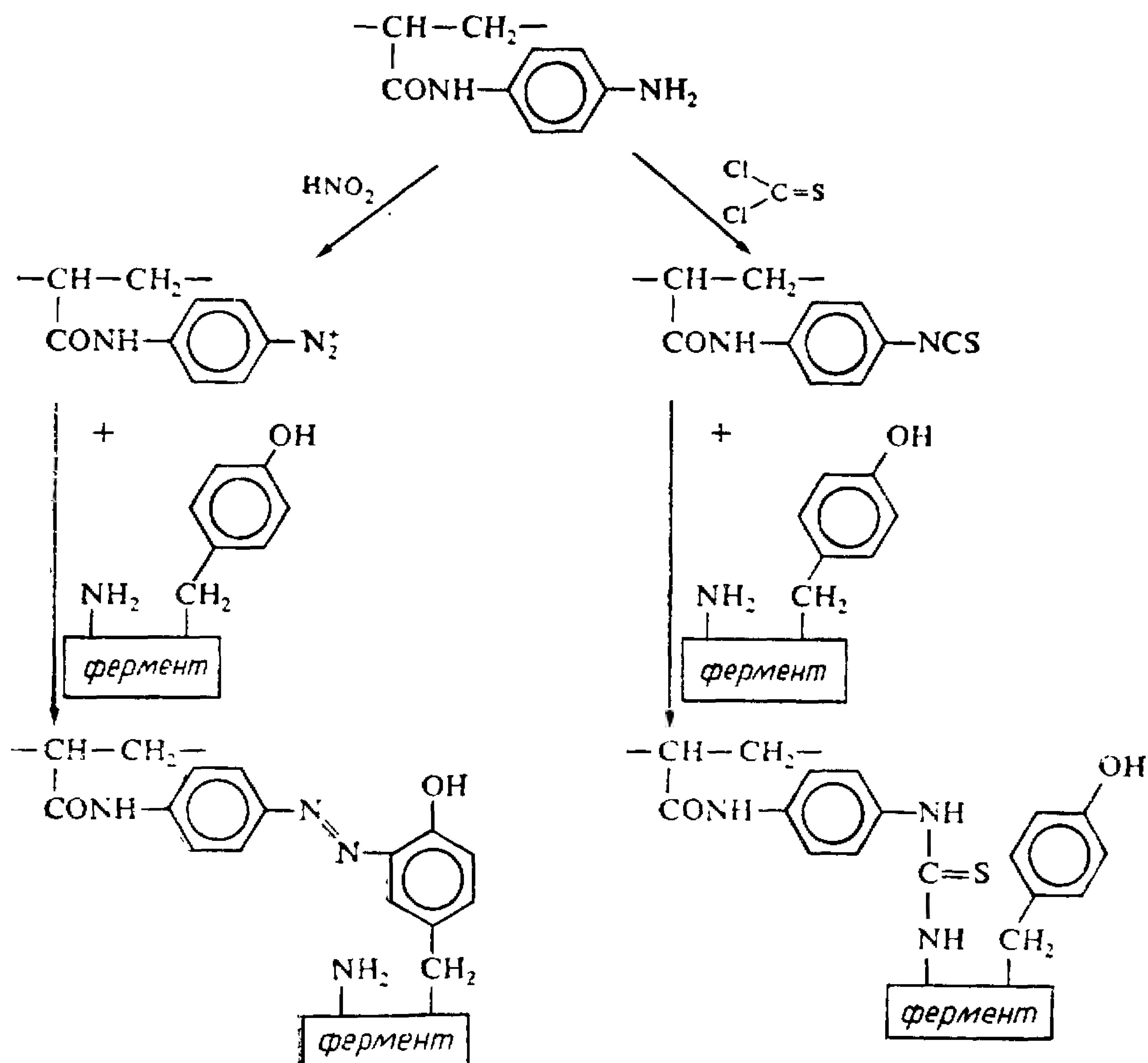
Из аминоэтильного производного и *п*-нитробензоилазида в присутствии диметилформамида (ДМФ), триэтиламина (ТЭА) дитионита натрия можно получить *п*-аминобензамидоэтильное производное:



Фирма Koch-Light Laboratories выпускает гидразидные производные полиакриламидных гелей (энзакрил АН) и полиакриламидные гели, содержащие остатки ароматических кислот (энзакрил АА). После активации азотистой кислотой энзакрил АН связывается со свободными аминогруппами аффинного лиганда.



После диазотирования азотистой кислотой энзакрил АА связывается с ароматическими остатками аффинных лигандов (например, в белках с тирозином и гистидином и с различными аминогруппами, но неспецифично и более медленно [39, 85]) или после активации тиофосгеном со свободными аминогруппами.



Эта же фирма производит энзакрил полиацеталь — сополимер диметилацеталя N-акрилиламиноацетальдегида и N,N′-метиленбисакриламида, — способный образовывать связи с аминогруппами белков; энзакрил политиол, взаимодействующий в

присутствии окислителей с SH-группами белков, и энзакрил политиолактон, взаимодействующий с гидроксильными группами белков (остатков серина, треонина или тирозина). Подробные методики присоединения аффинных лигандов к энзакрилам приведены в каталоге Koch-Light [52]. Однако авторы работы [101] предложили более простой метод непосредственного связывания аффинного лиганда с полиакриламидным гелем под действием глутарового альдегида. Взятый в избытке глутаровый альдегид реагирует одной из своих двух альдегидных групп со свободной амидной группой полиакриламидного геля. Оставшаяся свободной активная альдегидная группа взаимодействует с аминогруппами лиганда, добавляемого для последующего связывания. Таким образом образуется прочная связь между носителем и аффинным лигандом. Этот метод аналогичен предложенному несколько ранее [2] для получения нерастворимых иммуносорбентов; молекулы антигена или антитела полимеризуют под действием глутарового альдегида, образующего поперечные связи.

СТАБИЛЬНОСТЬ ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГЕЛЕЙ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

Согласно данным фирмы, биогель стабилен в области pH от 1—10. При более низких или более высоких pH возможен гидролиз нейтральных амидных групп. Не рекомендуется также использовать сильные окислители. Биогели устойчивы во всех обычных растворителях, применяемых для элюирования. Частицы полиакриламидного геля сильно прилипают к чистой поверхности стекла, и поэтому рекомендуется [46] силанизировать поверхность стекла или вести работу в полиэтиленовых сосудах.

ОКСИАЛКИЛМЕТАКРИЛАТНЫЕ ГЕЛИ

Гидрофильные оксиалкилметакрилатные гели, разработанные Чопеком и сотр. [10], готовят суспензионной полимеризацией оксиалкильных эфиров метакриловой кислоты с алкилендиметакрилатами. Число реакционноспособных групп, пористость и удельную поверхность геля можно менять в широких пределах, варьируя соотношение концентраций мономеров и инертных компонентов. Структура этого геля показана на рис. 7.4.

Свойства гидроксильных групп этого геля аналогичны свойствам гидроксильных групп агарозы. После активации бромцианом они, как и гидроксильные группы сефарозы, могут связываться с аминогруппами белков [88].

Семь типов этих гелей под названием «сфероны» выпускают фирмы Lachema (Брно ЧССР) и Hydron Labs., Inc. (Нью-Бран-

суик, Нью-Джерси, США). Как показано в табл. 7.1, отдельные гели различаются не только по величине предела исключения, но также и по удельной поверхности. Количество связанного химотрипсина непосредственно зависит от величины этой поверхности, а количество связанного глицина указывает на то, что

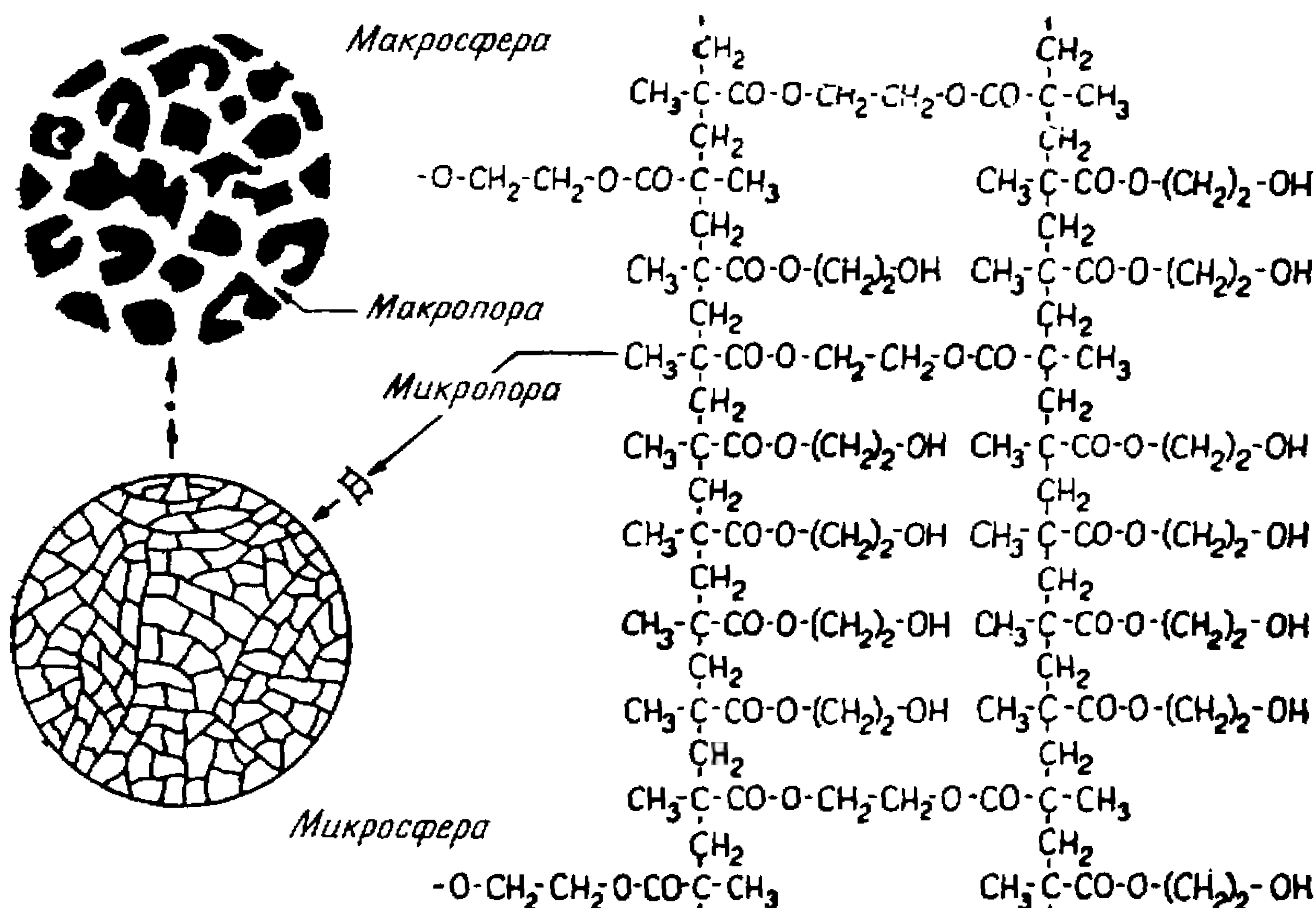


Рис. 7.4. Структура гранул гетерогенного гидрофильного макропористого геля сферон [65а].

Размеры микропор можно контролировать, меняя соотношение оксиалкилметакрилата и алкендиметилакрилата в процессе сополимеризации. Микропоры сильносшитых жестких микрочастиц ксерогеля очень малы, что не позволяет большим молекулам проникать в них. Микрочастицы в процессе образования агрегируют, в результате чего возникают гранулы макропористой структуры. Макропористость макросфер аэрогеля (необходимую для проникновения в них биополимеров), внутреннюю удельную поверхность и число групп, которые можно дополнительно химически модифицировать (для связывания аффинных лигандов), удается менять в широких пределах, варьируя соотношение инертных растворителей в процессе суспензионной сополимеризации.

различия в числе реакционноспособных гидроксильных групп невелики. Для связывания химотрипсина с молекулярной массой около 25 000 наилучшим оказался сферон 300. Для разделения соединений с большей молекулярной массой следует использовать сфероны с пропорционально бóльшим размером пор.

Сфероны химически устойчивы и прочны. Их структура не меняется после 8-часового нагревания в 1 н. растворе гликолята натрия при 150 °С или 24-часового кипячения с 20%-ной соляной кислотой. На них можно проводить хроматографирование при повышенном давлении. Выпускают сфероны в виде правильной формы сферических частиц различных размеров, причем для аффинной хроматографии наиболее пригодны частицы диаметром 100—200 мкм. При высушивании геля структура его не меняет-

Таблица 7.1

Количество химотрипсина, связанного с оксиалкилметакрилатными гелями (промышленное название «сферон»), как функция величины их удельной поверхности и величин протеолитической и эстеразной активности [88]

Гель	Предел исключения, мол. масса	Удельная поверхность, $м^2/мл$	Количество связанного белка, мг/мл		Протеолитическая активность[б]		pH оптимальной эстеразной активности	Эстеразная активность[б]	
			глицин[а]	химотрипсин	A_{280}·мин−1·мл−1	%[в]		мкмоль·мин−1·мл−1	%[в]
Сферон 10^5	10^8	0,96	0,5	0,73	—	—	—	—	—
Сферон 10^3	10^6	5,9	3,1	7,8	1,23	44	9,4	305	29
Сферон 700	$7\cdot10^5$	3,6	2,8	6,7	1,17	49	9,1	392	43
Сферон 500	$5\cdot10^5$	23	2,6	17,1	2,28	37	9,2	810	35
Сферон 300	$3\cdot10^5$	19,5	3,15	17,7	2,8	44	9,1	1320	55
Сферон 200	$2\cdot10^5$	0,6	3,3	6,9	1,33	53	9,0	626	67
Сферон 100	$1\cdot10^5$	0,2	2,6	4,3	0,58	38	9,1	354	61

[а] На примере глицина рассматривалось проникание и связывание низкомолекулярных соединений.

[б] Величины протеолитической активности определены по гидролизу денатурированного гемоглобина, а величины эстеразной активности — по данным о скорости расщепления этилового эфира ацетилтирозина.

[в] Относительная протеолитическая и эстеразная активность определены из соотношения активности 1 мл геля с иммобилизованным химотрипсином к активности свободного химотрипсина. Чтобы рассчитать активность свободного химотрипсина, количество (мг) химотрипсина, связанного с 1 мл геля, умножали на активность раствора 1 мг свободного химотрипсина.

ся; оксиалкилметакрилатные гели, как и акриламидные гели, биологически инертны и не подвергаются воздействию микроорганизмов.

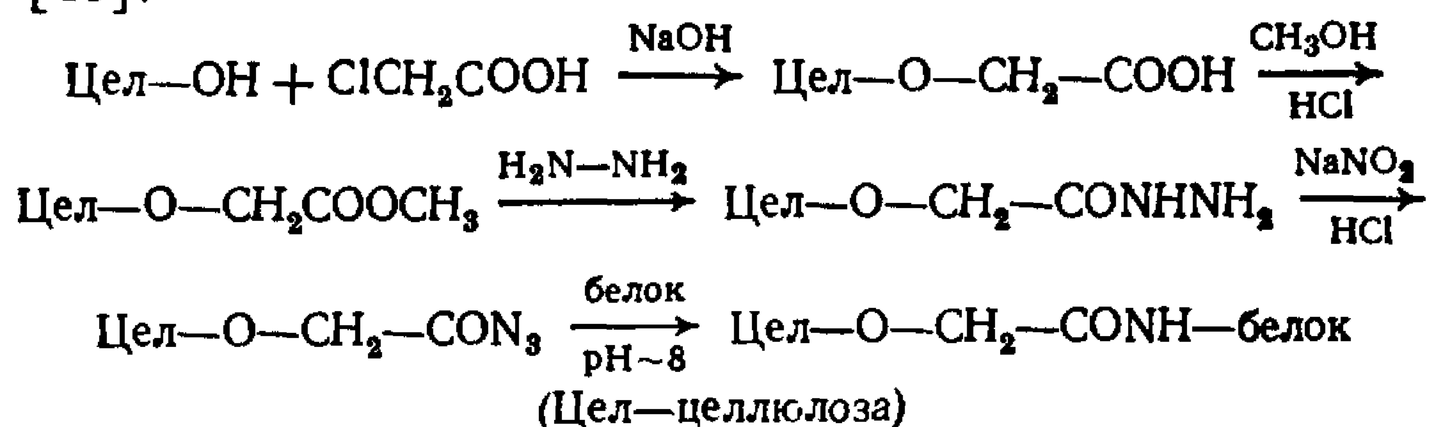
7.2.4. ЦЕЛЛЮЛОЗА И ЕЕ ПРОИЗВОДНЫЕ

Целлюлоза и ее производные являются классическим материалом, используемым уже более 20 лет в качестве носителей для различных аффинных лигандов. В следующих разделах мы обобщим данные о связывании целлюлозных носителей с различными биологически активными соединениями, опубликованные в ряде обзорных статей. Однако следует заметить, что в настоящее время целлюлозные носители используются относительно мало.

Целлюлозу и ее производные выпускает ряд фирм. В первую очередь это фирма Whatman, которая предлагает широкий ассортимент различных форм целлюлозы и ее ионообменных производных. Наряду с обычными производными целлюлозы фирма Serva Feinbiochemica GmbH (Гейдельберг, ФРГ) производит также ВА-целлюлозу (бромацетилцеллюлозу) для связывания белков, АЕ-целлюлозу (аминоэтилцеллюлозу) для связывания нуклеиновых кислот и РАВ-целлюлозу (*п*-аминобензилцеллюлозу), которая после диазотирования может связывать различные лиганды. Фирма Bio-Rad Laboratories (Ричмонд, Калифорния, США) поставляет под названием «целлекс» различные производные целлюлозы, применяемые в качестве носителей (целлекс РАВ — *п*-аминобензильное производное, целлекс А — аминоэтильное производное и др.). Фирмы MiLes-Servac и MiLes-Yeda выпускают следующие носители: гидразидное производное СМ-целлюлозы (энзайт-СМС), бромацетилцеллюлозу (ВАС) и *м*-аминобензилоксиметилцеллюлозу (АВМС).

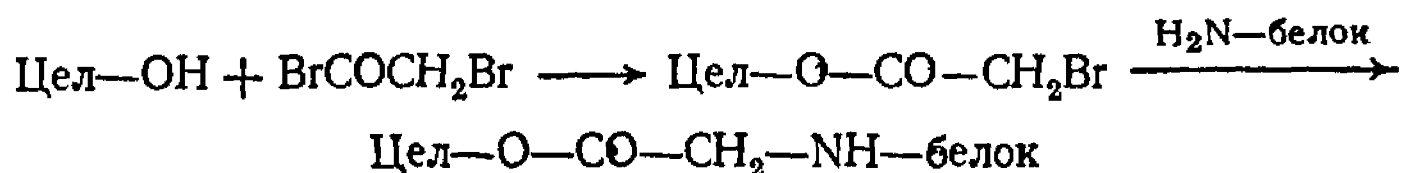
ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ПРИ СВЯЗЫВАНИИ АФФИННЫХ ЛИГАНДОВ

Обзор методов связывания ферментов с целлюлозой опубликован Круком и сотр. [12]. В этом обзоре, в частности, указывается, что наиболее широко используемый азидный метод Курциуса впервые примененный Мигелем и Эверсом [65], был модифицирован Мичелом и Самариа [66] и позднее Хорнби и сотр. [45].

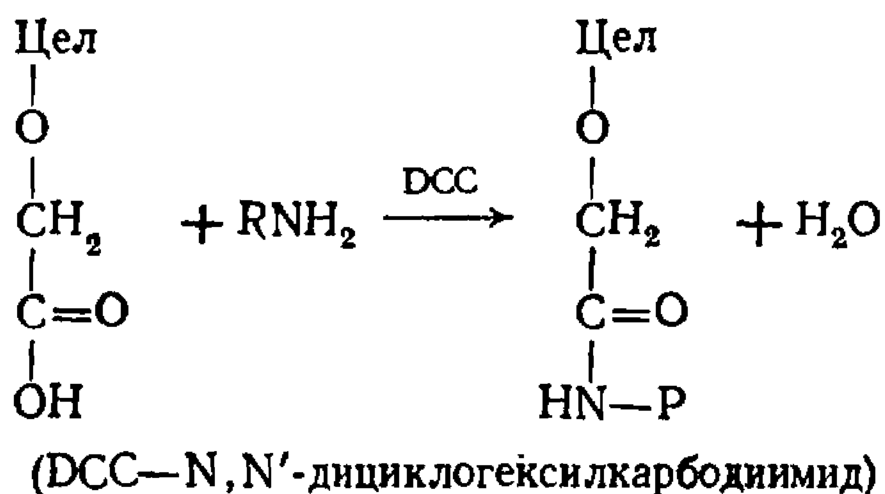


(Цел—целлюлоза)

Для связывания белков было применено [47] ацилирование OH-групп целлюлозы бромацетилбромидом и последующее алкилирование аминогрупп белка:



Как уже указывалось, присоединение аффинного лиганда к матрице триазиновым методом первоначально было разработано для целлюлозных носителей [49]. Присоединение лиганда к носителю с помощью диазониевых групп в 1951 г. Кемпбелл [7] впервые использовал для связывания биологически активного соединения с целлюлозой. Метод присоединения веществ со свободной аминогруппой к карбоксильной группе с помощью водорастворимого карбодиимида был первоначально разработан для связывания аффинных лигандов опять-таки с целлюлозой [100]



(DCC—N,N′-дициклогексилкарбодиимид)

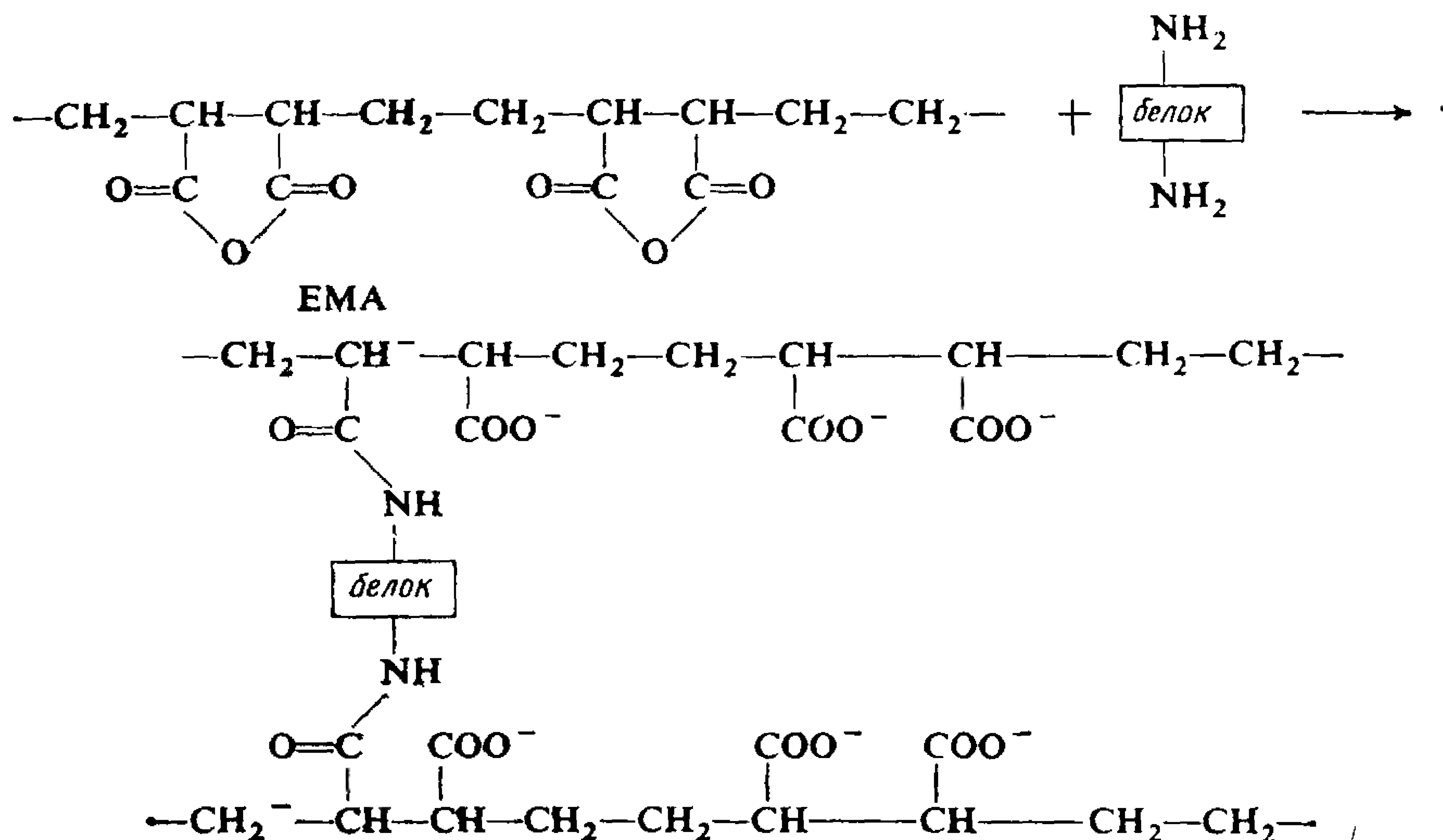
Методы ковалентного связывания нуклеотидов, полинуклеотидов и нуклеиновых кислот рассмотрены в обзоре [33]. Нуклеиновые кислоты обычно присоединяют к аминоэтилцеллюлозе методом периодатного окисления.

7.2.5. ДРУГИЕ НОСИТЕЛИ

Для связывания ферментов, антигенов и антител с нерастворимыми матрицами, как это указано в обзорах [78, 81], используется и ряд других носителей. Однако область их применения не столь широка. Например, производные полистирола [38, 40, 51, 59—61] больше не применяют, вероятно, из-за их гидрофобности [16], делающей невозможным достаточно хороший контакт между водой и твердой фазой.

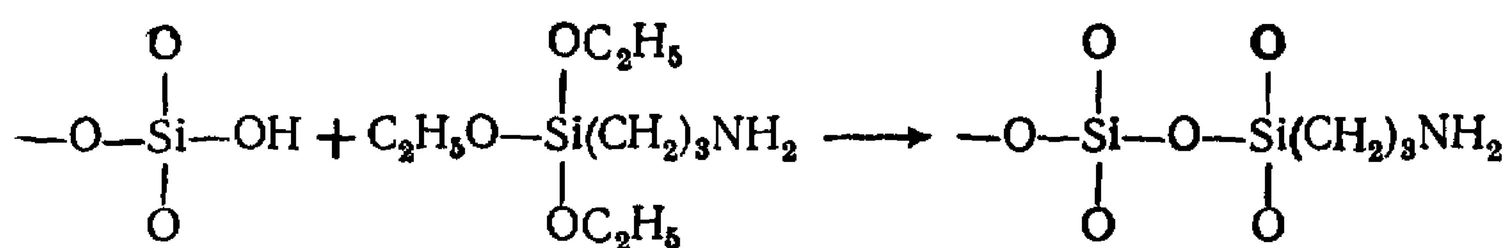
Применение сополимера этилена и малеинового ангидрида (EMA) и диальдегидкрахмал-метилендиамина (S-MDA) и способы связывания с ними лигандов рассматриваются в обзоре [34]. Получение нерастворимых в воде полианионных ферментов путем связывания с полифункциональными ацилирующими

агентами, а именно с сополимером этилена и малеинового ангидрида (ЕМА), описано в работах [54, 36], опубликованных в 1964 г. Полимер реагирует главным образом с ε-аминогруппами остатков лизина белков:

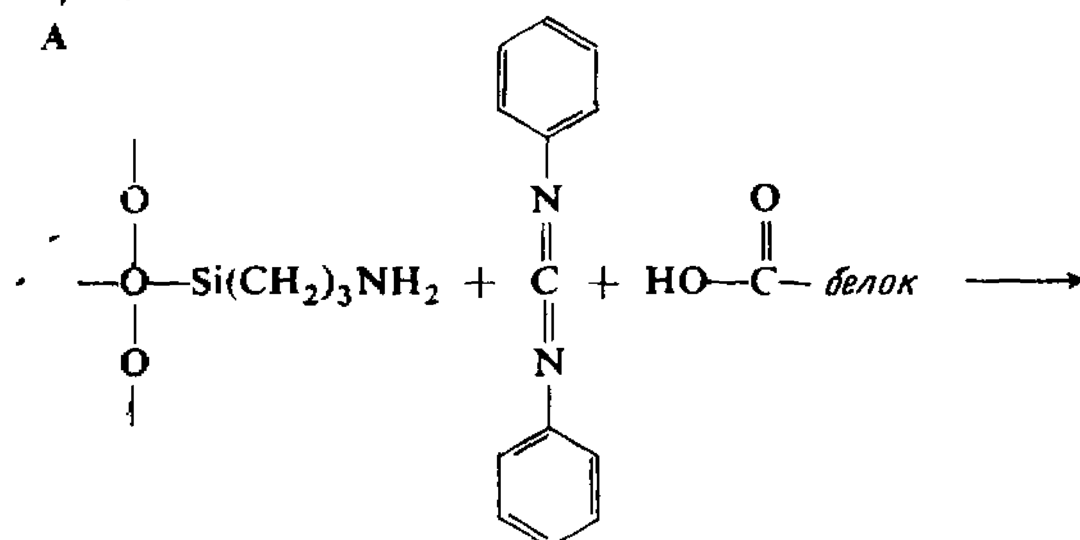


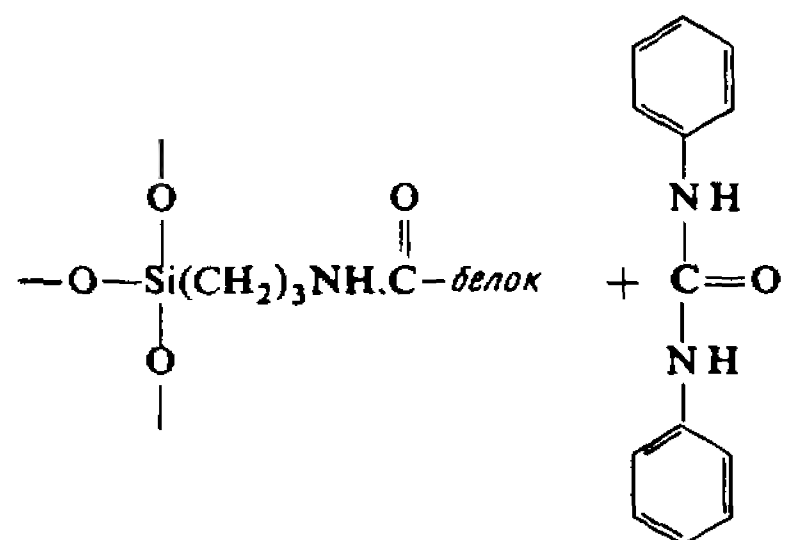
Непрореагировавший малеиновый ангидрид гидролизуется в водном растворе и дает матрицу полианионной природы. Широко применяемые в настоящее время нейтральные носители типа сефарозы или биогеля не обладают такими анионными свойствами. Свойства нерастворимых ферментов на носителе типа ЕМА подробно изучены рядом авторов [35, 36, 58, 81]. Полианионные ЕМА-производные протеолитических ферментов используются для получения некоторых ингибиторов этих ферментов [27, 30—32, 43, 44], а ЕМА-производное ингибитора трипсина и калликреина — для выделения калликреина и плазмина [28]. Сополимер этилена и малеинового ангидрида выпускается фирмой Monsanto Company (США) под названием ЕМА. Английская фирма Miles-Yeda синтезирует из этого полимера нерастворимые ферменты энзайт-ЕМА.

В заключение следует упомянуть о нерастворимых производных ферментов, получаемых в результате ковалентного связывания со стеклом. Эта методика разработана сотрудниками фирмы Corning Glass Co. [55, 64, 90—93, 96, 98, 99]. Сначала γ-аминопропилтриэтоксисилан связывается с поверхностью стекла, а затем в присутствии подходящего реагента образует связь с карбоксильной группой (*А*), аминогруппой (*Б*) или ароматической группой тирозина (*В*) иммобилизованного лиганда [94]:

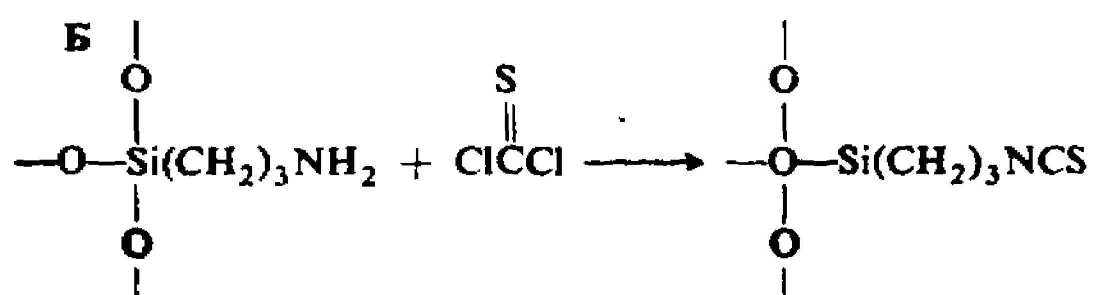


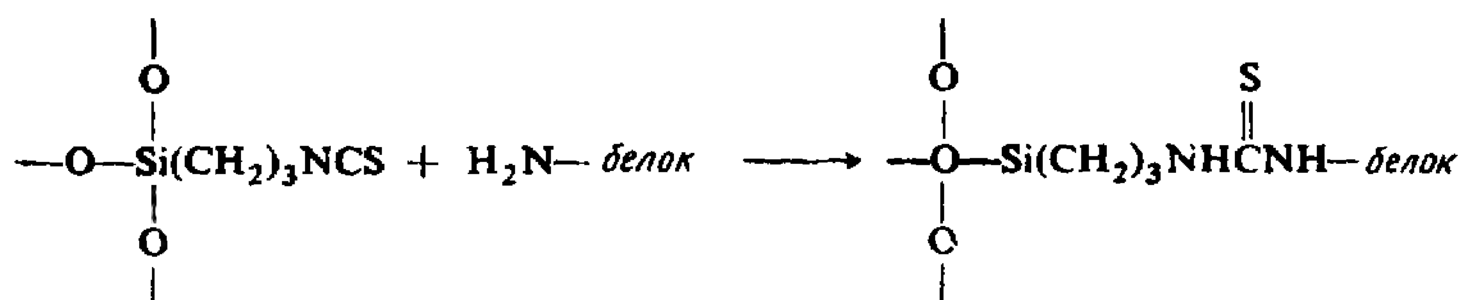
А



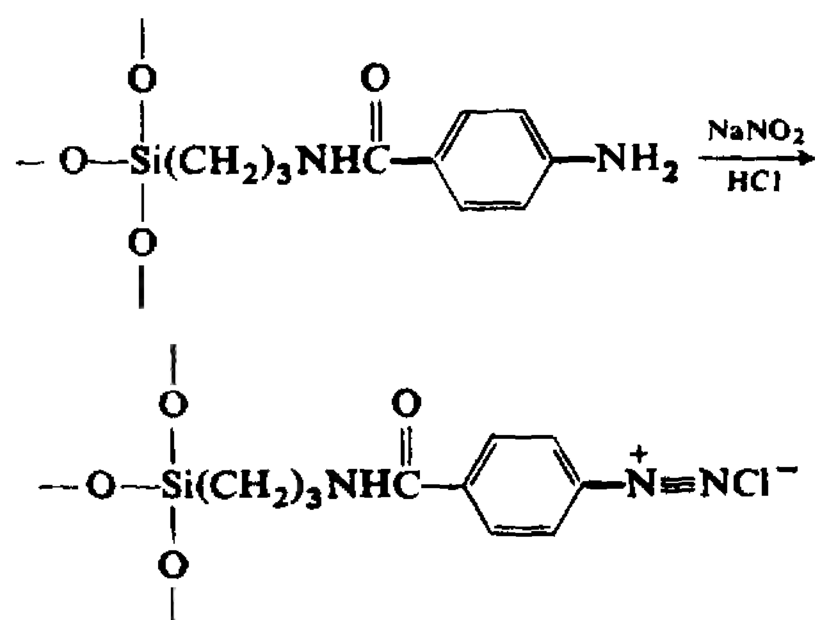


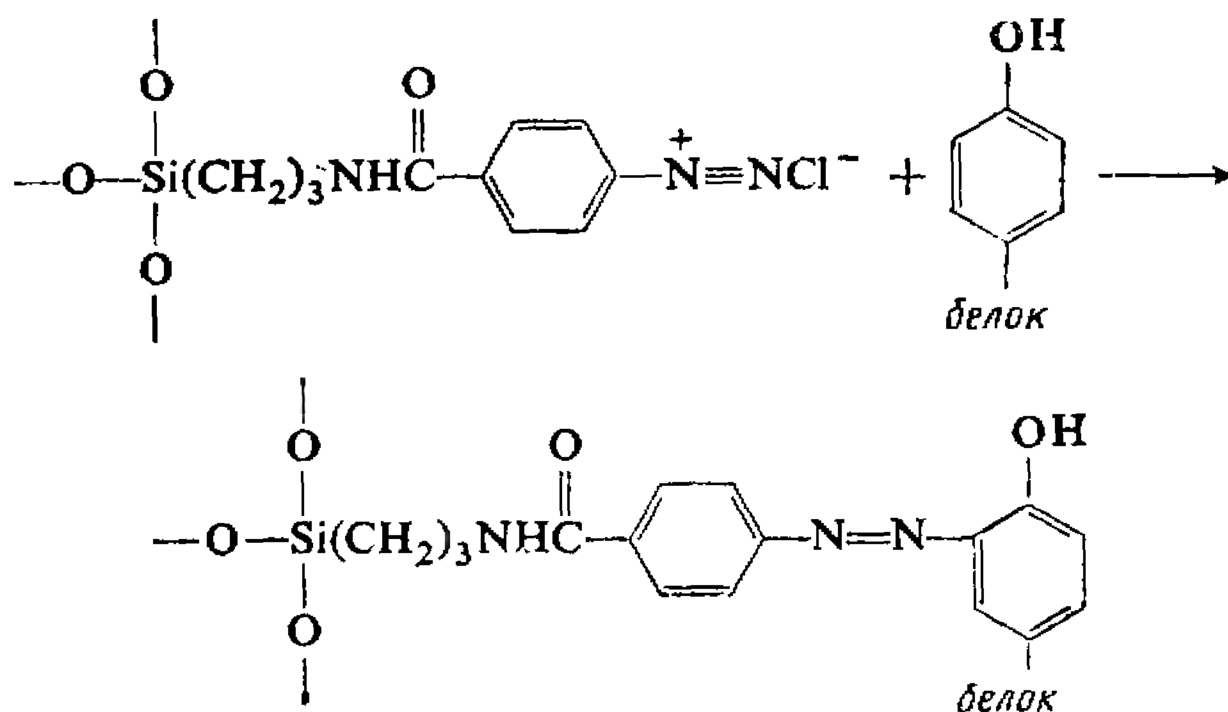
Б





В





Среди других неорганических носителей наряду со стеклом использовали также оксид никеля [97]. Перечень различных носителей, которые применялись для связывания аффинных лигандов, приведен в обзорах [34, 81].

7.3. ПРОМЫШЛЕННЫЕ АФФИННЫЕ ЛИГАНДЫ, СВЯЗАННЫЕ С НЕРАСТВОРИМЫМ НОСИТЕЛЕМ

На все возрастающую потребность в материалах для аффинной хроматографии, необходимых для выделения биологически активных соединений, впервые откликнулась фирма Miles Laboratories Ltd. (Англия), которая начала производство ряда пептидов, аминокислот, ферментов, антигенов и антител, связанных с нерастворимыми носителями. Для выделения химотрипсина [18] предназначен метиловый эфир ε-аминокапроил-D-триптофана, связанный с агарозой, для выделения папаина [6] — связанный с агарозой пептид агароза-Gly-Gly-Tyr(OBz)-Arg (где OBz — O-бензил), а для выделения рибонуклеазы [103] — агароза-5′-(4′-аминофенилфосфорилуридин-2′-(3′)-фосфат). Эта же фирма выпускает производные агарозы и L и D-триптофана, предназначенные для выделения белков, способных связывать триптофан [83], производные агарозы и L-фенилаланина — для выделения белков, способных связывать фенилаланин [8], и производные агарозы и L-тирозина — для выделения белков, способных связывать тирозин (например, 3-дезокси-D-арабиногептулозонат-7-фосфат синтетазы) [8]. На агарозе-тироксине выделяют белки, связывающие тироксин [73]. Присоединенный к агарозе конкавалин А (гликозилекс А) используется для

Таблица 7.2

Иммобилизованные ферменты фирмы Miles Laboratories Ltd.

Фермент	Фермент, иммобилизованный на СМ-целлюлозе[а] или на DEAE-целлюлозе[б]	Содержание белка, %	Фермент, иммобилизованный на сополимере этилена с малеиновым ангидридом	Содержание белка, %	Фермент, связанный с агарозой
Алкогольдегидрогеназа	Энзайт-YADH[б]	1—5			
α-Амилаза	Энзайт-α-амилаза[а]	1—5			
Бромелаин	Энзайт-бромелаин[а]	5—10			
Химотрипсин	Энзайт-химотрипсин[а]	5—10	Энзайт-ЕМА-химотрипсин	65—70	Энзайт-агароза-химотрипсин
Цитохром *c*	Энзайт-цитохром c[а]	5—10			
Фицин	Энзайт-фицин[а]	5—10			
Глюкозоксидаза	Энзайт-глюкозоксидаза[б]	5—10			
Лейцинаминопептидаза	Энзайт-лейцинаминопептидаза[б]	5—10			
Папаин	Энзайт-папаин[а]	5—10	Энзайт-ЕМА-папаин	60—65	Энзайт-агароза-папаин
Протеаза (Streptomyces griseus)	Энзайт-протеаза[а]	1—10			Энзайт-агароза-протеаза
Пероксидаза	Энзайт-пероксидаза[а]	1—10			
Рибонуклеаза	Энзайт-рибонуклеаза[а]	5—10			
Субтилопептидаза			Энзайт-ЕМА-субтилопептидаза B	50—55	
			Энзайт-ЕМА-субтилопептидаза A	50—55	
Трипсин	Энзайт-трипсин[а]	5—10	Энзайт-ЕМА-трипсин	65—70	Энзайт-агароза-трипсин
Уреаза	Энзайт-уреаза[б]	5—10			

выделения макромолекул, содержащих гликозильные концевые группы [104]. Выпускается также цистеин, связанный с СМ-целлюлозой.

Перечень нерастворимых ферментов, выпускаемых фирмой MiLes Laboratories Ltd., приведен в табл. 7.2. К СМ- и DEAE-целлюлозе ферменты присоединяют азидным методом [65], с помощью триазиновых производных [50], или по методу Баркера [5] путем диазотирования 2-окси-3-(*п*-аминофенокси)пропилового эфира целлюлозы. Иммобилизованные на целлюлозе ферменты содержат относительно мало белка. Ферменты с высоким содержанием белка получают путем связывания белков с сополимером этилена и малеинового ангидрида [54]. Ферменты, присоединенные к агарозе триазиновым методом, характеризуются высокой ферментативной активностью главным образом по отношению к макромолекулярным субстратам [50]. Препараты рекомендуется хранить в среде с pH не ниже 5,0.

Среди прочих иммуносорбентов фирма Miles-Seravac выпускает нерастворимые гаптены: связанные с агарозой динитрофенол, арсаниловую, гиббереллиновую и 3-индолилуксусную кислоты. Для выделения антител предназначены следующие связанные с агарозой антигены: бычий сывороточный альбумин, человеческие и козлиные иммуноглобулины. Для выделения антигенов производятся связанные с агарозой антитела против бычьего альбумина, гормона роста, глюкагона, человеческого IgG, динитрофенола, гиббереллиновой кислоты и 3-индолилуксусной кислоты. Конкавалин А, связанный с агарозой (Con А-сефароза), поставляет фирма Pharmacia Fine Chemicals (Швеция), а трипсин, связанный с целлюлозой, — фирма Merck (ФРГ).

7.4. ПРИМЕНЕНИЕ

7.4.1. АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НА ПРОИЗВОДНЫХ АГАРОЗЫ

ВЫДЕЛЕНИЕ КУРИНОГО ОВОИНГИБИТОРА МЕТОДОМ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА СЕФАРОЗЕ, СВЯЗАННОЙ С ХИМОТРИПСИНОМ [67]

Неочищенный куриный овомукоид, полученный по методу, описанному в статье [56], содержит два ингибитора трипсина [63]. Наряду с овомукоидом, ингибирующим только трипсин, он также содержит и другой ингибитор, названный авторами работы [63] овоингибитором, который действует не только на хи-

мотрипсин, но и на трипсин. Выделить овоингибитор достаточно сложно, так как в процессе выделения получаются фракции с различным содержанием сахаров, несущих заряд (например,

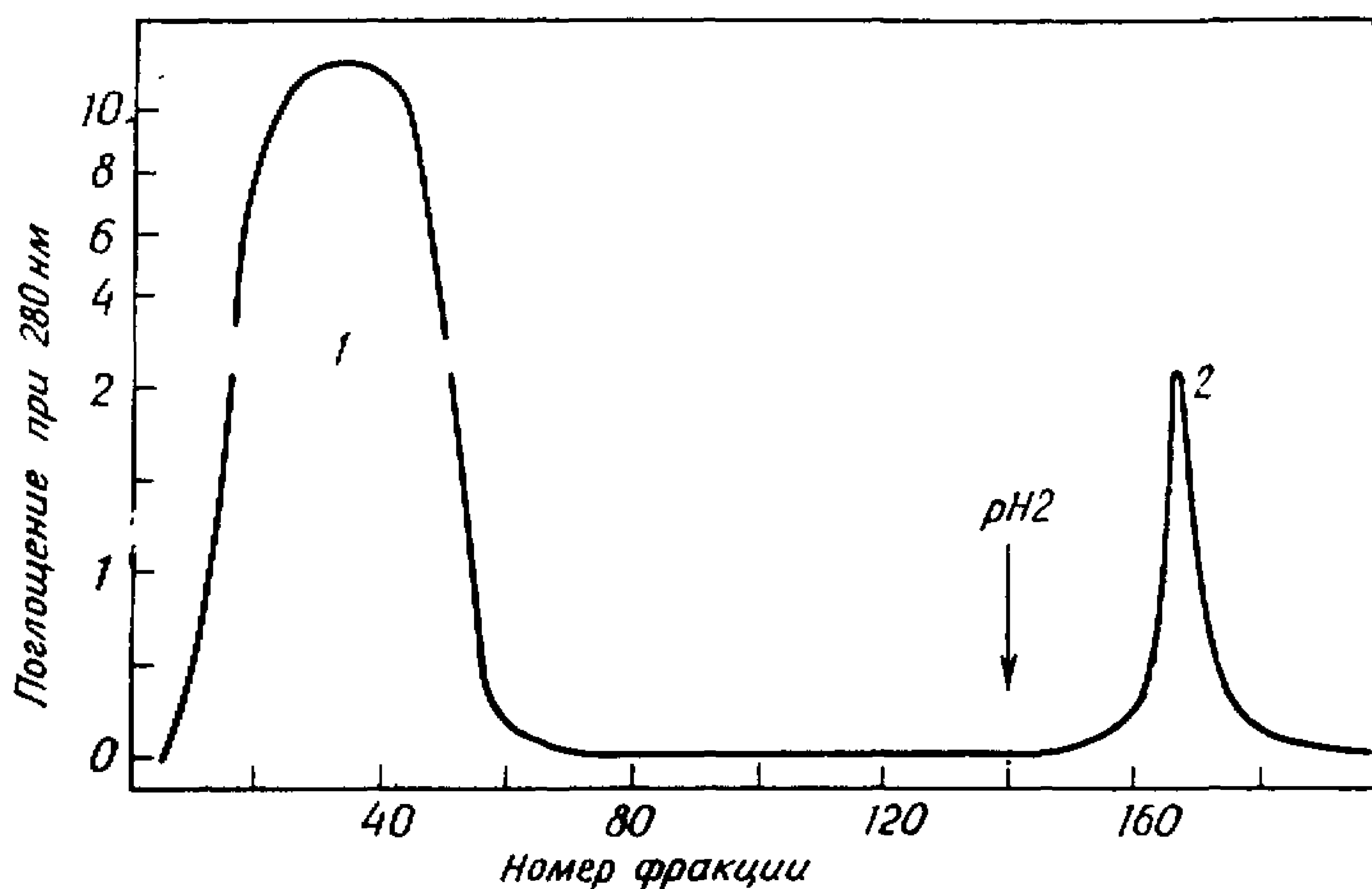


Рис. 7.5. Аффинная хроматография неочищенного куриного овомукоида на колонке с сефарозой, со связанным химотрипсином [21].

Колонка (26×1,6 см); уравновешивающий буфер — 0,2 М раствор триэтиламина, pH 8; образец: 3 г неочищенного овомукоида в 50 мл того же буферного раствора. Элюирование велось до фракции № 140; стрелкой показано начало элюирования буферным раствором 0,2 М KCl — HCl, pH 2,0; объем отбираемых фракций 3 мл.
Проба: *1* — овомукоид; *2* — овоингибитор.

сиаловой кислоты), но с одинаковыми аминокислотным составом, молекулярной массой и ингибирующей активностью. Методом аффинной хроматографии на сефарозе, ковалентно связанной с химотрипсином, Файнштейн [21] выделил куриный ингибитор из неочищенного овомукоида в одну стадию. Колонку с химотрипсин-сефарозой (26×1,6 см), полученной в результате связывания химотрипсина с сефарозой 2B [76], промывали в холодильнике 0,2М триэтиламмониевым буферным раствором (pH 8,0). Навеску сырого овомукоида (3 г) растворяли в 50 мл раствора и вводили образец в колонку. После начала элюирования отбор элюата (порциями по 3 мл) вели до тех пор, пока в элюате присутствовал белок (рис. 7.5). Далее меняли буферный раствор и элюировали раствором 2М KCl—HCl (pH 2) второй пик белка — овоингибитор. После диализа и лиофилизации фракция, соответствующая первому пику, не проявляла никакой ингибирующей активности по отношению к химотрипсину, в то время как фракция, соответствующая второму пику, проявляла

ингибирующую активность даже по отношению к химотрипсину. Первая фракция содержала овомукоид, вторая — чистый овоингибитор.

ВЫДЕЛЕНИЕ ХИМИОТРИПСИНА МЕТОДОМ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА СЕФАРОЗЕ, КОВАЛЕНТНО СВЯЗАННОЙ С МЕТИЛОВЫМ ЭФИРОМ ε-АМИНОКАПРОИЛ-D-ТРИПТОФАНА [18]

Метиловый эфир D-триптофана — относительно слабый ингибитор химотрипсина (константа ингибирования $K_i = 10^{-4}$). После его связывания с сефарозой [18] даже в такой высокой

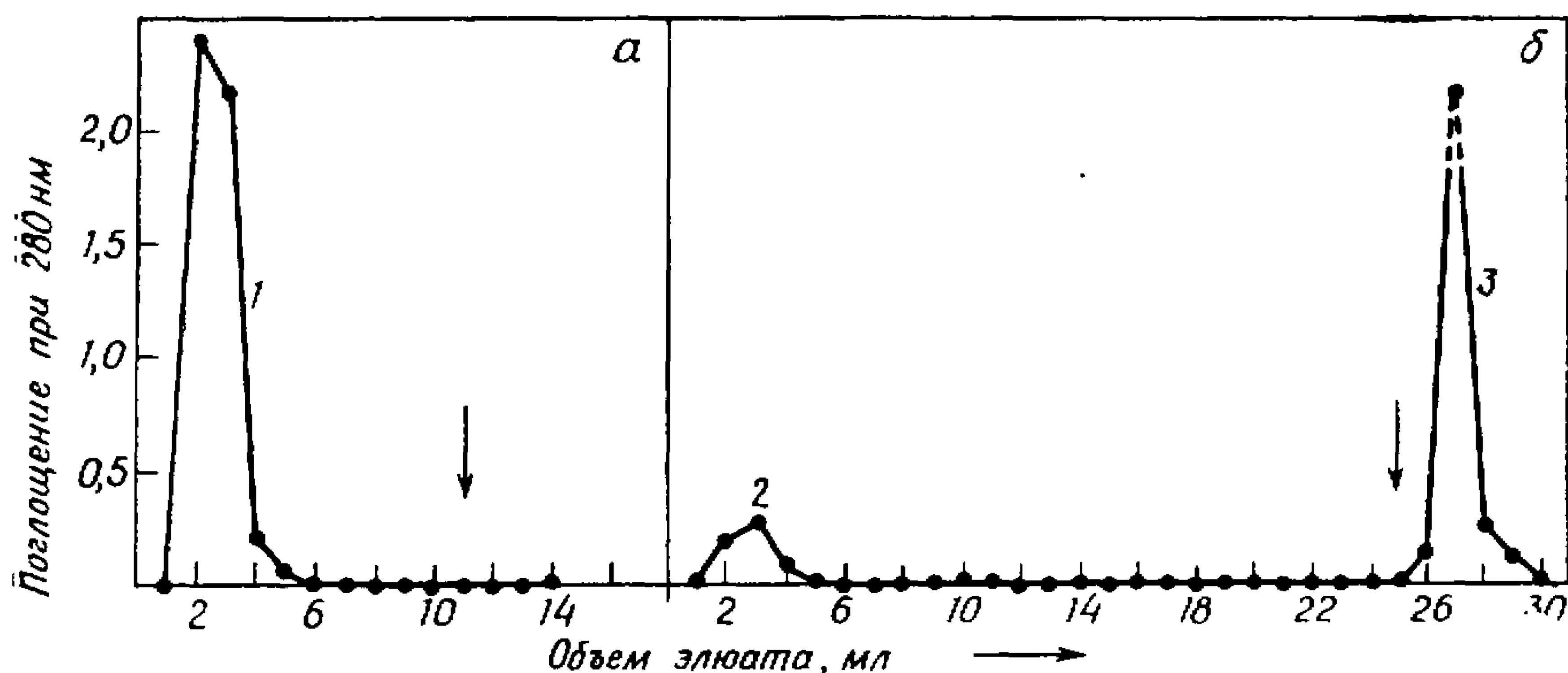


Рис. 7.6. Хроматографическое выделение химотрипсина на незамещенной сефарозе (*а*) и выделение того же соединения методом аффинной хроматографии на сефарозе, с привитым метиловым эфиром ε-аминокаприл-D-триптофана (*б*) [18].

Колонка 0,5×5 см; уравновешивающий буферный раствор — 0,05 М трис-HCl-буфер, pH 8; образец: 2,5 мг неочищенного химотрипсина в 0,5 мл этого же буферного раствора (в обоих случаях); скорость элюирования 40 мл/ч; объем отбираемых фракций 1 мл; стрелками показано начало элюирования 0,1 М уксусной кислотой.
Проба: *1* — смесь; *2* — примесные белки; *3* — химотрипсин.

концентрации, как 10 мкмоль на 1 мл сефарозы, этот носитель уже нельзя использовать для выделения химотрипсина. Однако если между этим ингибитором и матрицей ввести ε-аминокапроильную группу, то можно получить нерастворимый аффинный лиганд, вполне пригодный для выделения химотрипсина. На рис. 7.6 представлены результаты хроматографирования препарата химотрипсина, проведенного на колонке с незамещенной сефарозой и на колонке с сефарозой, связанной с метиловым эфиром ε-аминокапроил-D-триптофана. Колонку размером 0,5×5 см приводили в состояние равновесия, пропуская через нее 50 мМ трис-HCl-буферный раствор (pH 8,0). Образцы про-

Таблица 7.3

Примеры применения аффинной хроматографии на агарозе и ее производных

Выделяемое соединение	Аффинный лиганд	Литература
Ферменты		
Щелочная протеаза *Aspergillus oryzae*	Овоингибитор (высокомолекулярный природный ингибитор)	22
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	Никотинамидадениндинуклеотид (кофактор)	67
Папаин	*n*-Аминомеркуриацетат	82
РНК-полимераза	Дезоксирибонуклеиновая кислота	71
Трипсин	*n*-Аминобензамидин (низкомолекулярный ингибитор)	42
Протеазы пшеницы	Гемоглобин (субстрат)	9
Ингибиторы		
α_1-Антитрипсин	Конкавалин А	69
Овоингибитор	Химотрипсин	21
Пептиды		
Пептид активного центра нуклеазы стафилококков	Нуклеаза	120

Пептид участка связывания антидинитрофенильных антител	Антитело	25
Пептиды, содержащие нитротирозин	Антитела против нитротирозина	41
Другие соединения		
Аденозин-3′,5′-монофосфат	АМР-связывающий белок	24
Агглютинин соевых бобов	N-ε-Аминокапронил-β-D-галактопиранозиламин	37
Антитела против инсулина	Инсулин	13
Авидин	Биоцитин	17
α-Фетопротеин	Антитело	70
α-Фетопротеин	Конкавалин А	72
Липиды и липопротеиды	Додециламин	20
Тироксин, связанный с белками	Тироксин	73
Сывороточный альбумин	Жирные кислоты	74
Вазопрессин	Нейрофизин	77
Вирусы	Антитело	62

бы (2,5 мг каждого) вводили в виде раствора в 0,5 мл этого же буфера. Элюирование вели при скорости потока 40 мл/ч при комнатной температуре; элюат отбирали порциями по 1 мл. α-Химотрипсин элюировался примерно 0,1М уксусной кислотой (pH 3,0) (стрелка на рисунке) и отделялся от неактивного белка, содержащегося в первом пике. α-Химотрипсин может также элюироваться раствором сильного конкурентного ингибитора, например 0,018М раствором β-фенилпропионамида ($K_i = 6 \cdot 10^{-3}$) [16].

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ АГАРОЗЫ И ЕЕ ПРОИЗВОДНЫХ

Количество исследований, в которых в качестве нерастворимого носителя применяется агароза и ее производные с привитыми аффинными лигандами, увеличивается по мере развития аффинной хроматографии, и полный обзор таких работ в рамках одной главы практически невозможен. Так, в 1968 г. были опубликованы всего две работы, описывающие использование агарозы в качестве носителя в аффинной хроматографии, в 1969 г. таких работ было уже примерно 10, а в 1970 г. — около 20, а в 1971 г. — более 40, в 1972 г. — более 70, а в последующие годы это число было вновь превышено. В табл. 7.3 приведены некоторые примеры использования агарозы в аффинной хроматографии, показывающие возможности этого метода.

7.4.2. АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ КЛЕТОК НА БИОГЕЛЕ P-6 СО СВЯЗАННЫМ ГАПТЕНОМ [86]

Клетки, продуцирующие антитела против конъюгированного антигена азофенил-β-лактозида, можно избирательно отделить от других клеток [86] на колонке с биогелем P-6 со связанным гаптеном.

Сухой биогель P-6 (5 г) переводят в гидразидное, а затем в ацилазидное производное [46] и 150 мл полученной смеси обрабатывают 20 мл 5 мМ раствора гистамина и приблизительно 3,75 мл триэтиламина; pH реакционной массы следует поддерживать примерно постоянным около 9,5. Обработку ведут в течение часа при 0 °С, после этого добавляют 20 мл этаноламина, чтобы удалить оставшиеся ацилазидные группы. Гель выдерживают в течение часа, промывают и уравновешивают 0,25М боратным буфером, pH 9,0. Далее при 0 °С к раствору 5,1 ммоль *п*-аминофенилгликозида в 45 мл 0,25М соляной кислоты добавляют 5 мл раствора нитрита натрия (5 ммоль, 0,34 г). Через 15 мин раствор образующейся диазониевой соли медленно, при

постоянном перемешивании добавляют к 100 мл суспензии биогеля со связанным гистамином в боратном буфере, pH 9,0. Реакционную смесь выдерживают несколько часов при 4 °С. Биогель, связанный с азофенилгликозидом, промывают несколько раз декантацией 1%-ным раствором хлорида натрия, переносят в силиконизованную колонку (25×1,5 см) и промывают 0,15М хлоридом натрия в 0,02М фосфатном буфере, pH 7,2. С 1 мл геля на такой колонке связывается 0,2—0,5 мг антител.

Суспензию клеток (~1—2 мл) хроматографируют при 4 °С на приготовленной таким образом колонке в фосфатно-солевом буферном растворе (pH 7,2) при скорости потока буферного раствора 40—60 мл/мин. Клетки, не обладающие сродством к связанному гаптену, свободно проходят через колонку, в то время как клетки, имеющие сродство к связанному гаптену, количественно элюируются несколько позднее. По окончании разделения колонку промывают 100 мл раствора лактозы и снова уравновешивают фосфатно-солевым буферным раствором; биогель со связанным гаптеном хранят при 4 °С в 0,02%-ном растворе азида натрия.

Применение акриламидных гелей в аффинной хроматографии в настоящее время весьма ограниченно. Куатреказас [14] показал, что выделение относительно малой молекулы нуклеазы стафилококков можно проводить не только на сефарозе, но и на биогеле Р-300, однако для выделения больших молекул, например β-галактозидазы [84], этот гель мало пригоден из-за низкой пористости.

7.4.3. АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НА ПРОИЗВОДНЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

ОЧИСТКА АНТИТЕЛ С ПОМОЩЬЮ ИММУНОСОРБЕНТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПРИМЕНЕНИЕМ БРОМАЦЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЫ (ВАС) [79]

Оптимальные значения pH для физической адсорбции антигенов на ВАС в 0,15М фосфатно-цитратных буферных растворах (табл. 7.4) определены Робинсом и сотр. [79]. Антиген (300—500 мг) растворяют в таком буферном растворе, в котором адсорбция оптимальна, и к полученному раствору добавляют 1 г (сухая масса) ВАС. Суспензию интенсивно перемешивают 30 мин магнитной мешалкой при комнатной температуре. После центрифугирования (10 мин при 1000 *g*) реакционную массу суспендируют в 30 мл 0,1М натрийбикарбонатного буфера, pH 8,9, и оставляют при 4 °С на 24 ч, периодически перемешивая. При этом значении pH происходит химическое связывание антигена и ВАС. Суспензию вновь центрифугируют 10 мин при 10 000 *g*

и целлюлозу вновь суспендируют в буферном растворе (0,05*М* 2-аминоэтанол — 0,1*М* бикарбонат натрия, pH 8,9), чтобы удалить непрореагировавший бром. После 24-часовой выдержки при 4 °С несвязанный антиген удаляют центрифугированием, суспензию конъюгата промывают раствором 0,15*М* хлорида натрия до полного исчезновения антигена в супернатанте (контролируется по поглощению при 280 нм). Для того чтобы на целлюлозе остался только ковалентно связанный антиген, ее вновь суспендируют в 30 мл 8*М* раствора мочевины и медленно перемешивают 24 ч при комнатной температуре. После центрифугирования промывку 8*М* раствором мочевины повторяют до исчезновения антигена (контролируется по поглощению при 280 нм). Далее конъюгат перемешивают в течение часа при 37 °С в 0,1*М* уксусной кислоте. В этих условиях антиген не должен элюироваться с целлюлозы. После центрифугирования конъюгат суспендируют в 0,15*М* фосфатном буфере, pH 7,4 и хранят при 4 °С. Конъюгат сохраняет в значительной мере свою активность по крайней мере в течение 6 мес. Количество антител, связанных с целлюлозой, по данным анализа содержания азота в сухих образцах, приведено в табл. 7.4.

Антитела выделяют из сыворотки центрифугированием при 20 000 *g* в течение 1 ч при 4 °С. После удаления липидных веществ иммуносорбент смешивают с сывороткой и суспензию 2 ч перемешивают магнитной мешалкой при 4 °С. Конъюгат целлюлозы центрифугируют при 20 000 *g* в течение 20 мин. Адсорбент вновь суспендируют в 0,15*М* растворе хлорида натрия и центрифугируют еще 10 мин при той же скорости. Эту операцию повторяют (обычно 3 или 4 раза) до тех пор, пока поглощение промывных вод при 280 нм снизится до 0,08. Антитела элюируют из адсорбента после суспендирования комплекса антитело-иммуносорбент в 0,1*М* уксусной кислоте, pH 2,8. После часового перемешивания при 37 °С суспензию центрифугируют 30 мин при 20 000 *g*, супернатант диализуют в 350—700-кратном количестве 0,01 н. трис-HCl-буфера (pH 7,0), содержащего 0,1*М* раствор хлорида натрия.

ОБЗОР ПРИМЕНЕНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Как было показано выше, целлюлоза была первым носителем в аффинной хроматографии. Обзор данных по применению целлюлозы для выделения антител и антигенов приведен в работе [81]. Данные о ковалентном связывании нуклеотидов, полинуклеотидов и нуклеиновых кислот обобщены в статье [33]. Хотя в настоящее время в аффинной хроматографии применяются и другие твердые носители, целлюлоза не потеряла своего значения. Трипсин, связанный с целлюлозой, по-прежнему ис-

Таблица 7.4

Состав иммуносорбентов, полученных из бромацетилцеллюлозы (БАЦ), и способность их к связыванию антител [79]

Антиген, связанный с целлюлозой	pH физической адсорбции на BAC	Количество связанного антигена, мг/г сорбента	Количество адсорбированных и элюированных антител, мг/г сорбента	Средний выход, %
Белки				
Бычий сывороточный альбумин	3,8	286	180	92
Лизоцим	2,0	285	131	87
Папаин	3,8	167	325	75
Рибонуклеаза	2,2	24	72	87
Гаптен-белковые конъюгаты				
ДНФ-сывороточный альбумин человека	3,2	280	284	97
Поли-DL-фенилаланил-сывороточный альбумин человека	4,6	38	140	88
Поли-L-тирозил-желатина	4,6	375	210	88
Синтетические полипептиды				
p(Tyr, Glu)-pDL-ALa ... pLys (Tyr, Glu, Ala)	4,0	286	240	96
	4,6	33	140	76
Синтетические полипептидные конъюгаты				
Уридил-pDL-Ala ... pLys	4,6	34	40	76

пользуется для выделения ингибиторов из различных источников [23, 29, 87]. С помощью ингибиторов трипсина, связанных с целлюлозой, удалось выделить некоторые протеазы [68]. В 1971 г. была выделена аминоацилаза [80]. Лоу и Дин [19, 57] считают, что целлюлоза остается наилучшим носителем для связывания никотинамидных нуклеотидов, и они выделили на ней NAD-связывающие дегидрогеназы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ahrgren L., Kagedal L., Akerström S.*, Acta Chem. Scand., **26**, 285 (1972).
2. *Avrameas S., Ternynck T.*, Immunochemistry, **6**, 53 (1969).
3. *Axen R., Ernback S.*, Eur. J. Biochem., **18**, 351 (1971).
4. *Axen R., Porath J., Ernback S.*, Nature, **214**, 1302 (1967).
5. *Barker S. A., Somers P. J.*, Carbohydrate Res., **8**, 491 (1968).
6. *Blumberg S., Schechter I., Berger A.*, Eur. J. Biochem., **15**, 97 (1970).
7. *Campbell D. H., Luescher E. L., Lerman L. S.*, Proc. Natl. Acad. Sci. US, **37**, 575 (1951).
8. *Chan W. W. C., Takahashi M.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **37**, 272 (1969).
9. *Chua G. K., Bushuk W.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **37**, 545 (1969).
10. *Coupek J., Krivákovó M., Pokorný S.*, J. Polymer. Sci., Symp., **42**, 182 (1973).
11. *Craven G. R., Steers E. Jr., Anfinsen C. B.*, J. Biol. Chem., **240**, 2468 (1965).
12. *Crook E. M., Brocklehurst K., Wharton C. W.*, Methods in Enzymology, Vol. 19, Academic Press, New York (1970), p. 963.
13. *Cuatrecasas P.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **35**, 531 (1969).
14. *Cuatrecasas P.*, J. Biol. Chem., **245**, 3059 (1970).
15. *Cuatrecasas P., Anfinsen C. B.*, Ann. Review Biochem., **40**, 259 (1971).
16. *Cuatrecasas P., Anfinsen C. B.*, Methods in Enzymology, Vol. 22, Academic Press, New York, p. 345 (1971).
17. *Cuatrecasas P., Wilchek M.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **33**, 235 (1968).
18. *Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C. B.*, Proc. Natl. Acad. Sci. US, **61**, 636 (1968).
19. *Dean P. D. G., Lowe C. R.*, Biochem. J., **127**, 11 P (1972).
20. *Deutsch D. G., Fogleman D. J., von Kaulla K. N.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **50**, 758 (1973).
21. *Feinstein G.*, Biochim. Biophys. Acta, **236**, 73 (1971).
22. *Feinstein G., Gertier A.*, Biochim. Biophys. Acta, **309**, 196 (1973).
23. *Fink E., Jaumann E., Fritz H., Ingrisch H., Werle E.*, Z. Physiol. Chem., **352**, 1591 (1971).
24. *Fisch H. U., Pliška V., Schwyzer R.*, Eur. J. Biochem., **30**, 1 (1972).
25. *Franěk F.*, Eur. J. Biochem., 33, 59 (1973).
26. *Friedberg F.*, Chromatog. Rev., **14**, 121 (1971).
27. *Frits H., Brey B., Béress L.*, Z. Physiol. Chem., **353**, 19 (1972).
28. *Fritz H., Brey B., Schmal A., Werie E.*, Z. Physiol. Chem., **350**, 617 (1969).
29. *Fritz H., Gebhardt M., Mester R., Illchmann K., Hochstrasser K.*, Z. Physiol. Chem., **351**, 571 (1970).
30. *Fritz H., Hochstrasser K., Werle E., Brey E., Gebhardt B. M.*, Z. Anal. Chem., **243**, 452 (1968).
31. *Fritz H., Schult H., Hutzel M., Wiederman M., Werle E.*, Z. Physiol. Chem., **348**, 308 (1967).

32. *Fritz H., Schult H., Neudeeher M., Werle E.*, Angew. Chem., **78**, 775 (1966).
33. *Gilman P. T.*, Methods in Enzymology, Vol. 21, Academic Press, New York (1971), p. 191.
34. *Goldstein L.*, Methods in Enzymology, Vol. 19, Academic Press, New York (1970, p. 935.
35. *Goldstein L., Katchalsky E.*, Z. Anal. Chem., **243**, 375 (1968).
36. *Goldstein L., Levin Y., Katchalski E.*, Biochemistry, **3**, 1913 (1964).
37. *Gordon J. A., Blumberg S., Lis H., Sharon N.*, FEBS Letters, **24**, 193 (1972).
38. *Grubhoffer N., Schleith L.*, Z. Physiol. Chem., **297**, 108 (1954).
39. *Gundlach G., Kohne C., Turba F.*, Biochem. Z., **336**, 215 (1962).
40. *Gyenes C., Rose B., Schon S. H.*, Nature, **181**, 1465 (1958).
41. *Helman M., Givol D.*, Biochem. J., **125**, 971 (1971).
42. *Hixson H. F.. Nishikawa A. H.*, Arch. Biochem. Biophys., **154**, 501 (1973).
43. *Hochstrasser K., Reichert R., Matzner M., Werle E.*, Z. Klin. Chem. Biochem., **10**, 104 (1972).
44. *Hochstrasser K., Reichert R., Schwarz S., Werle E.*, Z. Physiol. Chem., **353**, 221 (1972).
45. *Hornby W. E., Lilly M. D., Crook E. M.*, Biochem. J., **98**, 420 (1966).
46. *Inman J. K., Dintzis H. M.*, Biochemistry, **8**, 4074 (1969).
47. *Jagendorf A. T., Patchornik A., Sela M. P.*, Biochim. Biophys. Acta, **78**, 516 (1963).
48. *Kalderon N., Silman I., Blumberg S., Dudai Y.*, Biochim. Biophys. Acta, **207**, 560 (1970).
49. *Kay G., Crook E. M.*, Nature, **216**, 514 (1967).
50. *Kay G., Lilly M. D.*, Biochim. Biophys. Acta, **198**, 276 (1970).
51. *Knet L. H., Slade J. H. R.*, Biochem. J., **12**, 77 (1960).
52. Koch-Light Lab. Cataloque KL4, 476 (1973).
53. *Lerman L. S.*, Proc. Natl. Acad. Sci. US, **39**, 232 (1953).
54. *Levin Y., Pecht M., Goldstein L., Katchalski E.*, Biochemistry, **3**, 1905 (1964).
55. *Line W. F., Kwong A., Weetall H. H.*, Biochim. Biophys. Acta, **242**, 194 (1971).
56. *Lineweaver H., Murray C. W.*, J. Biol. Chem., **171**, 565 (1947).
57. *Lowe C. R., Dean P. D. G.*, FEBS Letters, **14**, 313 (1971).
58. *Lowey S., Goldstein L., Cohen C., Luck S. M.*, J. Mol. Biol., **23**, 287 (1967).
59. *Manecke G., Forster H. J.*, Makromol. Chem., **91**, 136 (1966).
60. *Manecke G., Günzel G.*, Naturwiss., **54**, 531 (1967).
61. *Manecke G., Singer S.*, Makromol. Chem., **39**, 13 (1960).
62. *Matheka H. D., Mussgay M.*, Arch. Gesamte Virusforsch., **27**, 13 (1969).
63. *Matsishima K.*, Science, **127**, 1178 (1958).
64. *Messing R. A*, Enzymologia, **39**, 12 (1970).
65. *Micheel F., Ewers J.*, Makromol. Chem., **3**, 200 (1949).
65a. *Mikeš O., Štrop P., Zbrožek J., Čoupek J.*, J. Chromatog., **119**, 339 (1976).
66. *Mitz M. A., Summaria L. J.*, Nature, **189**, 576 (1961).
67. *Mosbach K., Guilford H., Ohlsson R., Scott M.*, Biochem. J., **127**, 625 (1972).
68. *Mosolov V. V., Lushnikova E. V.*, Biokhimiya, **35**, 440 (1970).
69. *Murthy R. J., Hercz A.*, FEBS Letters, **32**, 243 (1973).
70. *Nichi S., Hirai H.*, Biochim. Biophys. Acta, **278**, 293 (1972).
71. *Nüsslein G., Heyden B.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **47**, 282 (1972).
71a. *O'Cara P., Bary S., Griffin T.*, Methods Enzymol., **34**, 108 (1974).
72. *Page M.*, Canad. J. Biochem., **51**, 1213 (1973).
73. *Pensky J., Marshall J. S.*, Arch. Biochem. Biophys., **135**, 304 (1969).
74. *Peters T. Jr., Taniuchi H., Anfinsen C. B. Jr.*, J. Biol. Chem., **248**, 2447 (1973).
75. *Porath J.*, Biochimie, **55**, 943 (1973).
76. *Porath J., Axén R., Ernback S.*, Nature, **215**, 1491 (1967).

77. *Pradelles P., Morgat J. L., Fromageot P., Canier M., Bonne D., Cohen P., Bockaert J., Jard S.,* FEBS Letters, **26**, 189 (1972).
78. *Reiner R. H., Walch A.,* Chromatographia, **4**, 578 (1971).
79. *Robbins J. B., Haimovich J., Sela M.,* Immunochemistry, **4**, 11 (1967).
80. *Sato T., Mori T., Tosa T., Chibata I.,* Arch. Biochem. Biophys., **147**, 788 (1971).
81. *Silman I. H., Katchalski E.,* Ann. Rev. Biochem., **35**, 873 (1966).
82. *Sluyterman L. A. AE., Wijdenes J.,* Biochim. Biophys. Acta, **200**, 593 (1970).
83. *Sprossler B., Lingens F.,* FEBS Letters, **6**, 232 (1970).
84. *Steers E., Cuatrecasas P., Pollard H.,* J. Biol. Chem., **246**, 196 (1971).
85. *Tabachnik M., Sobotka H.,* J. Biol. Chem., **235**, 1051 (1960).
86. *Truffa-Bachi P., Wofsy L.,* Proc. Natl. Acad. Sci. US, **66**, 685 (1970).
87. *Tschesche H., Dietl T., Marx R., Fritz H.,* Z. Phys. Chem., **353**, 483 (1972).
88. *Turková J., Hubálková O., Křiváková M., Coupek J.,* Biochim. Biophys. Acta, **322**, 1 (1973).
89. *Turková J.,* J. Chromatog., **91**, 267 (1974).
90. *Weetall H. H., Baum G.,* Biotech. Bioeng., **12**, 399 (1970).
91. *Weetall H. H.,* Biochim. Biophys. Acta, **212**, 1 (1970).
92. *Weetall H. H.,* Nature, **223**, 959 (1969).
93. *Weetall H. H.,* Nature, **232**, 473 (1971).
94. *Weetall H. H.,* Research Development, 22, 18 (1971).
95. *Weetall H. H.,* Science, **166**, 615 (1969).
96. *Weetall H. H., Hersh L. S.,* Biochim. Biophys. Acta, **185**, 464 (1969).
97. *Weetall H. H., Hersh L. S.,* Biochim. Biophys. Acta, **206**, 54 (1970).
98. *Weibel M. K., Bright H. J.,* Biochem. J. 801 (1971).
99. *Weibel M. K., Weetall H. H., Bright H. J.,* Biochem. Biophys. Res. Commun., **44**, 347 (1971).
100. *Weliky N., Weetall H. H., Gilden R. V., Campbell D. H.,* Immunochemistry, **1**, 219 (1964).
101. *Weston P. D., Avrameas S.,* Biochem. Biophys. Res. Commun., **45**, 1574 (1971).
102. *Wilchek M.,* FEBS Letters, **7**, 161 (1970).
102a. *Wilchek M.,* Advan. Exp. Med. Biol., **42**, 15 (1974).
103. *Wilchek M., Gorecki M.,* Eur. J. Biochem., **11**, 491 (1969).
103a. *Wilchek M. T., Oka Topper Y. J.,* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72**, 1055 (1975).
104. *Yariv J., Kalb A. J., Levitzki A.,* Biochim. Biophys. Acta, **195**, 303 (1968).

Глава 8. Автоматизация работы колонок в жидкостной хроматографии

Б. Мелоун

Институт органической химии и биохимии Чехословацкой Академии наук, Прага

8.1. ВВЕДЕНИЕ

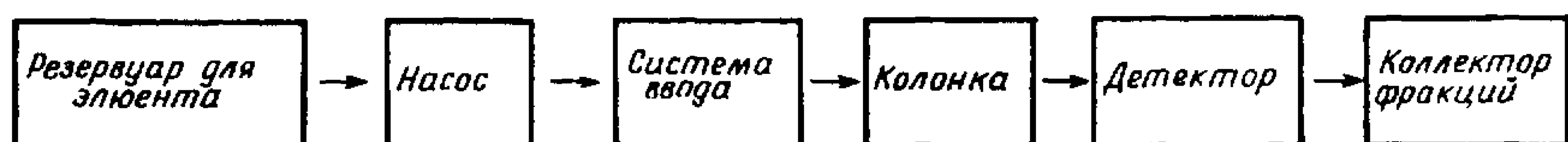
Основное требование, предъявляемое к автоматическому оборудованию, состоит в следующем: все входящие в состав установки приборы в каждый заданный момент должны выполнять требуемые операции. Уровень и степень автоматизации хроматографического процесса зависят от ряда факторов, различным образом влияющих на конечные результаты. Общие требования — высокая воспроизводимость отдельных операций и способность системы работать длительное время. К автоматическим установкам, применяемым в аналитических целях, предъявляются также такие требования, как повышенная чувствительность и быстрота анализа. Конструкторы сложных автоматических хроматографов часто пытаются найти оптимальное сочетание нередко противоречивых требований. Жидкостная хроматография прошла длинный путь развития от открытых систем с колонками большого диаметра до классических систем низкого давления (вплоть до 30 атм) с колонками диаметром 8 мм и высокоскоростных систем высокого давления. В настоящее время используются давления до 400 атм и колонки диаметром 1—3 мм, заполненные адсорбентом с частицами диаметром меньше 10 мкм.

Установки высокого класса точности и отдельные модули таких установок изготавливаются специальными фирмами и исследовательскими институтами* при участии инженеров-механиков, специалистов по электронике, оптике, вычислительной технике и т. д. Приборы для жидкостной хроматографии удовлетворяют требованиям ионообменной хроматографии — лиган-

* Названия и адреса фирм указаны на конце главы и упоминаются в тексте только в иллюстративных целях.

дообменной и гель-хроматографии. В продаже имеются как одно-, так и многоцелевые приборы; приборы последнего типа, их называют «жидкостными хроматографами» или «полианализаторами» (например, Бекман), пригодны для анализа смесей одного класса, например смесей аминокислот, пептидов или нуклеотидов. В то же время «открытые», или «модульные», конструкции (например, «Technicon» и «Jed») легко приспособить для анализа качественно различных групп соединений.

В большинстве приборов предусмотрен ряд устройств, обеспечивающих исключение возможности дрейфа или существенного изменения выбранных параметров. Основу всех автоматизированных приборов составляет система отсчета времени, с которой связаны все остальные части системы. Схема хроматографа очень проста:



и далее мы примерно в такой последовательности рассмотрим принцип его работы.

8.2. РЕЗЕРВУАРЫ ДЛЯ ЭЛЮЕНТА И ГИДРАВЛИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ

Основной материал, из которого изготавливаются емкости для элюента, — это стекло, в этих же целях применяются пластмассы, полиэтилен, полипропилен, политетрафторэтилен или нержавеющая сталь. Очень часто элюент необходимо освободить от растворенных в нем газов, в этих случаях используют резервуары закрытого типа, в крышках которых имеются два отверстия для ввода азота или другого инертного газа и подсоединения к вакуумной линии. В процессе обезгаживания содержимое резервуара можно перемешивать магнитной мешалкой. К насосу элюент поступает через отверстие, расположенное в нижней точке резервуара. Для работы с коррозионно-активными элюентами Янг и Мэгс [43] рекомендуют использовать контейнеры из пластмассы или нержавеющей стали, расположенные непосредственно внутри резервуара, находящегося под давлением. В аналитических колонках, где расход растворителя мал, используются и другие типы резервуаров, например большие шприцы, или элюент помещают непосредственно в спиральный резервуар системы высокого давления.

Для гидравлических соединений в хроматографической системе наиболее часто используются капилляры из синтетических пластмасс. Широко употребляются тонкостенные капилляры из полиэтилена или тефлона, которые соединяются с аппаратурой при помощи стандартных, герметичных и легко заменяемых соединений, изготавливаемых из пластмассы или нержавеющей стали. Один из вариантов такого соединения для системы низкого давления показан на рис. 8.1. Коническая шайба из сили-

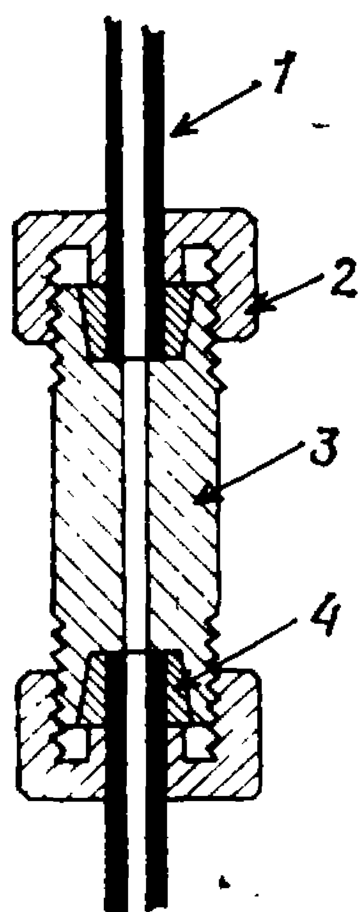


Рис. 8.1. Соединение капиллярных трубок для работы при низких давлениях.

1 — тефлоновый или полиэтиленовый капилляр; *2* — гайка; *3* — центральная часть соединения; *4* — силиконовая прокладка.

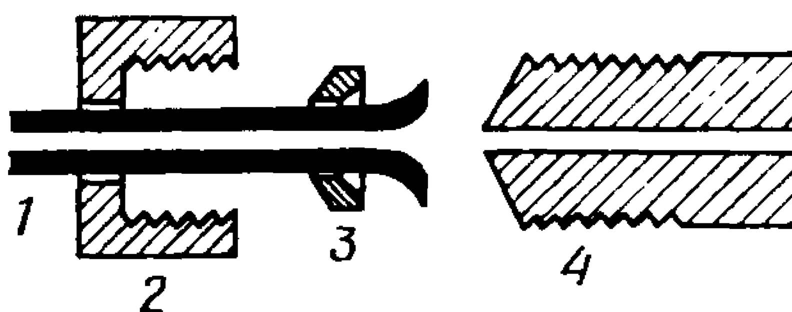


Рис. 8.2. Соединение капиллярных трубок для работы при средних давлениях.

1 — капилляр; *2* — гайка; *3* — уплотняющее кольцо; *4* — конусное соединение.

коновой резины обжимает капилляр при завинчивании гайки. На рис. 8.2 дана схема соединения с тефлоновым капилляром; этим соединением можно пользоваться при давлениях до 40 атм. Капилляр снабжен накидной гайкой и предохраняющей конической шайбой. Конец капилляра размягчают нагреванием и развальцовывают на конической металлической форме, после чего капилляр устанавливают на соответствующее место в аппаратуре и, завинчивая гайку, получают герметичное соединение. Такие соединения пригодны также для стеклянных колонок. В некоторые типы рассматриваемых соединений помещают прокладки из силиконовых полимеров, через которые вводят пробу шприцем. Широкий ассортимент соединений выпускают фирмы Pharmacia, Serva и Jobling. В системах высокого давления (до 200 атм) используются значительно более жесткие соединения и пластмассовые капилляры в них заменены на капилляры из нержавеющей стали. Соединения фирмы Swagelock диаметром от 0,18 до 5 см изготавливаются из латуни или нержавеющей стали.

8.3. КРАНЫ И НАСОСЫ

8.3.1. КРАНЫ

В гидравлических системах важную роль играют краны. Они работают пневматически и приводятся в действие сервосистемой. В соответствии с принципом действия различают краны четырех типов: поворотные, золотниковые, мембранные, сильфонные. Контактирующие с растворителем поверхности кранов изготавливают главным образом из тефлона кель-ф или витон. На рис. 8.3 показан четырехпозиционный кран, используемый в двухколоночном хроматографе для раздельного соединения детектора с колонками. В одном положении крана элюат из колонки K_1 поступает в детектор D, а элюат из второй колонки идет в слив. Во втором рабочем положении крана колонка K_2 соединена с детектором, а колонка K_1 — со сливом. Такой тип крана используется также как шунт петли ввода в газовой хроматографии.

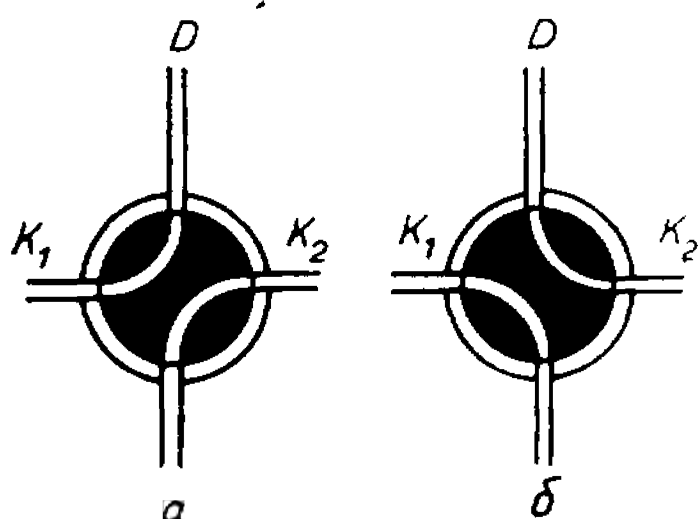


Рис. 8.3. Схема четырехходового крана.

а — соединение колонки K_1 с детектором *D*; *б* — соединение колонки K_2 с детектором.

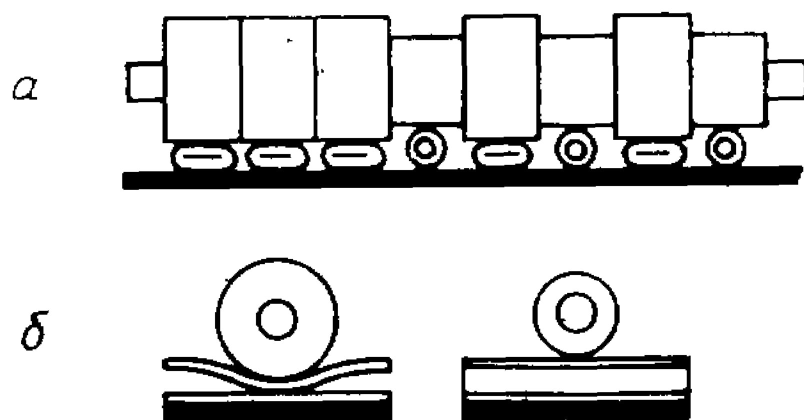


Рис. 8.4. Схема действия крана Perivalve (Technicon).

а — управляющий вал с кольцами и капиллярами; *б* — перекрытие капилляров при использовании различных колец.

Многопозиционные краны применяются при градиентном элюировании для последовательного подключения колонки к системе различных буферных растворов, а также в системах ввода пробы. Шестипозиционные краны выпускают конструкторские бюро Чехословацкой Академии наук и ряд фирм. В некоторых приборах, например Hitachi, Perkin-Elmer, используются золотниковые краны с приводом от мотора.

Перистальтический кран Perivalve фирмы Technicon (рис. 8.4) имеет принципиально другую конструкцию. Его работа контролируется программным модулем. Кран Perivalve открывает и закрывает поток элюента через 16 пластмассовых капилляров. Капилляры расположены на твердой подложке, а над

ними помещены два диска, вращающиеся вокруг оси, перпендикулярной капиллярам. По периметру этих дисков закреплены 12 приводных рычагов, на которых крепятся по две упорных прокладки различного диаметра, выбранные так, чтобы расстояние между твердой подложкой и кольцом наименьшего диаметра равнялось диаметру капилляра, а кольцо большего диаметра пережимало капилляр и прерывало поток элюента. На приводном стержне закреплены 16 колец, регулирующих поток через все 16 капилляров. Программный модуль поворачивает диски через определенные промежутки времени на 30°, и при этом ряд колец приходит в соприкосновение с капиллярами. С помощью соответствующих приборов можно пропускать поток элюента через любое число капилляров в любом порядке.

Вращающиеся части Perivalve снабжены рядом микропереключателей, которые регистрируют положение колец. Микропереключатели работают также и на других устройствах и контролируют их работу, особенно насосов, или начало нового хроматографического цикла. Таким образом кран этого типа используется как для гидравлического, так и электронного контроля за хроматографическим процессом. Для поддержания давления в гидравлической системе используются также и клапаны. Капиллярная система закрыта мембраной, прижимаемой к концу трубки пружиной. После каждого поступления жидкости из цилиндра насоса клапан открывается. Некоторые фирмы-поставщики рекомендуют для хорошей работы клапанов минимальное превышение давления около 0,1 атм. В системах высокого давления исправная работа клапанов является проблемой особой важности. Главная часть клапана — мембрана, в которой закреплен маленький шарик. Он располагается в седле и перекрывает коммуникацию в гидравлической системе. Величину давления, при котором клапан срабатывает, можно установить, выбрав подходящую пружину, прижимающую шарик к седлу.

8.3.2. НАСОСЫ

Общее требование, предъявляемое к работе насосов, — отсутствие пульсаций потока, поскольку пульсации могут привести к нежелательным отклонениям в показаниях детектора. Второе требование — постоянство потока, так как только при этом условии можно проводить качественный и количественный анализ. Используемые для изготовления насосов материалы должны быть химически стойкими и коррозионно-устойчивыми.

Почти все насосы новых типов могут плавно менять объемную скорость подачи элюента. Обзорная статья по применению насосов высокого давления опубликована Чэндлером и МакНейром [8].

В насосе простейшего типа* элюент помещают в спиральную трубку из нержавеющей стали и вводят в хроматографическую систему под действием постоянного давления газа. Расход элюента зависит от проницаемости колонки и давления газа, которое может достигать 100 атм. Основное преимущество такой системы — практически полное исключение пульсаций. В пневматическом, или жидкостном усилительном насосе давление газа не превышает 15 атм. Газ давит на поршень большого диаметра, соединенный через тягу со вторым поршнем малого диаметра, который давит на жидкую подвижную фазу. Отношение площадей поршней и дает коэффициент усиления. Такие насосы очень удобны для аналитических работ. Насосы, в которых давление с первого поршня передается на второй через промежуточную жидкость, работают по тому же принципу. На первый поршень действует давление 35 атм, тогда как второй поршень развивает давление 210 атм. Иногда первый поршень заменяют на мембрану, которая отделяет гидравлическую жидкость от элюента, поступающего в хроматографическую систему. Длительной свободной от пульсаций подачи можно добиться, используя два или более насосов, работающих в противофазе, или введя в систему демпфер пульсаций.

Фирма Waters Associates в своей «Solvent Delivery System» («Система доставки растворителя»), модель 6000, разработала метод равномерной подачи элюента с помощью двух спаренных насосных головок. Скорость подачи устанавливается по шкале с ценой деления 0,1 мл/мин в диапазоне от 0,1 до 9,9 мл/мин. Насос выпускают в двух модификациях для интервала 0—42 атм и 0—420 атм; ограничение верхнего предела давления можно менять от 100 до 420 атм. Систему можно подключать к программному модулю для управления насосом, позволяющему программировать изменение скорости потока. За один ход поршня в систему хроматографа поступает 0,1 мл жидкости, частота перемещения поршня регулируется. Насос снабжен системой, компенсирующей влияние сжимаемости подвижной фазы. В последнее время появились насосы, в которых один первичный поршень соединен с несколькими вторичными, прокачивающими одновременно несколько различных растворителей при давлении до 200 атм (Durrum). Шприцевые насосы также приспособлены для работы при высоких давлениях, и с их помощью можно получать очень стабильные потоки. Эти насосы особенно удобны при небольшом расходе элюента, соответствующем объему шприца. Они обычно выпускаются с зубчатой передачей, и

---

* Возможность использования осмотического давления в системе подачи элюента в колонку обсуждается в статье Шмиделя Е. Б., Березкина В. Г., Коломиец Л. Н., J. Chromotogr., **202**, 279 (1980). — *Прим. ред.*

в некоторых модификациях [21] используется один скользящий механизм для управления несколькими (вплоть до шести) шприцами.

Широко применяются возвратно-поступательные насосы с одним поршнем. Отдельные типы этих насосов снабжены плоскопараллельными или шариковыми клапанами (LKB, Mikrotechna). В настоящее время большинство насосов имеют двухшариковые клапаны секционного типа и спаренный выходной клапан. Жидкость прокачивается в результате возвратно-поступательного движения рубинового или стального поршня (Milton Roy —mini-Pump», Mikrotechna micropump MC-300). Уплотнения осуществляются тефлоновыми кольцами, которые наиболее удобны для работы с растворителями, содержащими пиридин, вызывающий деструкцию резины. Насос Beckman Accu-Flow относится к насосам такого же типа и используется в аминокислотном анализаторе Unichrom, обеспечивая скорость потока от 3 до 160 мл/ч. У этого насоса сапфировые поршень и клапаны, и он может работать до давлений 70 атм. С помощью двухпоршневого насоса Joel с тефлоновым цилиндром и пирексовым поршнем можно прокачивать разбавленную серную кислоту под давлением до 30 атм. Недостаток таких насосов — пульсация потока. Поэтому многие фирмы оснащают хроматографы насосами с многопоршневыми головками, где поршни движутся в противофазе. Обычно применяется одна трансмиссия с мотором, что значительно облегчает синхронизацию работы поршней. Спаренная система с двухпоршневым насосом и управляемым распределительным краном использована в жидкостном хроматографе фирм Hitachi, Perkin-Elmer, модель 034 [11]. При использовании эксцентриков специального вида достигается практически постоянный поток элюента. Прибор работает вплоть до давлений 30 атм (рис. 8.5). Во всех возвратно-поступательных насосах существует опасность попадания воздуха внутрь системы. Поэтому прокачиваемую жидкость необходимо предварительно обезгаживать или в гидравлической линии необходимо устанавливать ловушки пузырьков.

Перистальтические насосы — это насосы главным образом низкого давления. Воспроизводимость потока у них составляет около 1%. Использование пластмассового диска большого диаметра гарантирует практическое отсутствие пульсаций при небольшой скорости вращения. Во многих случаях этот тип насосов предпочтителен, так как в них исключен контакт транспортируемой жидкости с металлом. Обычные силиконовые трубки выдерживают до 500 ч работы. Перистальтические насосы используют как распределители потока, если необходимо отделить часть потока в системе низкого давления, главным образом для приготовления растворов и изменения состава. Ряд таких насо-

сов с плавно меняющимся потоком применяется в приборе для временного включения максимальной эффективности при установке рабочей скорости. Кроме того, они позволяют менять направление потока жидкости на обратное. Фирма LKB предоставляет широкий набор такого рода насосов, например Perpex, Vario Perpex и Multiperpex. Насос Vario Perpex с трубками внутреннего диаметра 1,35 мм дает поток со скоростью от 0,6 до

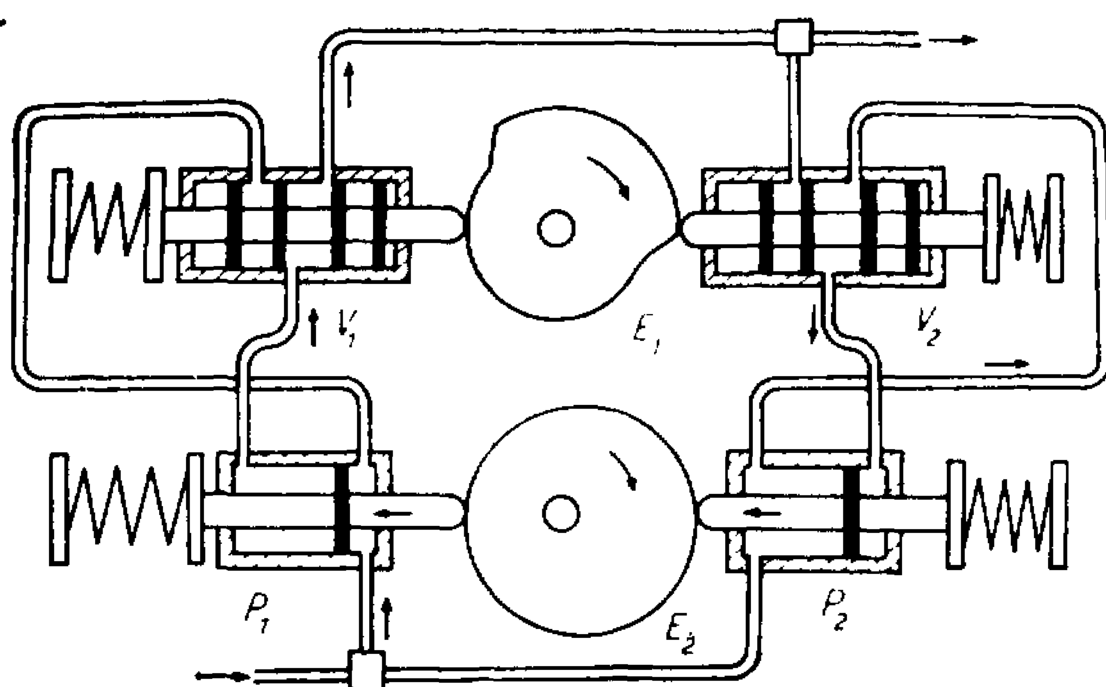


Рис. 8.5. Схема насоса Minimal Flow (Hitachi Perkin-Elmer) [11].

P_1 и P_2 — цилиндры высокого давления с плунжерами; V_1 и V_2 — клапаны; E_1 и E_2 — эксцентрики, расположенные на общей оси.

80 мл/ч. Трубка размещается в первом желобке на пластине с вращающимся диском. Второй желобок позволяет использовать трубки диаметром 3 мм, скорость потока составляет при этом от 3,2 до 400 мл/ч при максимальном давлении до 2 атм. Насос Multiperpex с одной приводной системой допускает применение до четырех трубок. Трубка диаметром 1,3 мм дает скорость потока от 20 до 1200 мл/ч, а трубки с внутренним диаметром 3 мм — поток со скоростью от 70 до 4500 мл/ч. Эти насосы могут оснащаться различными передаточными механизмами, и скорость подаваемого ими потока можно снизить вплоть до 0,02 мл/ч. Перистальтический насос P3 фирмы Pharmacia имеет трехканальную систему с трубками стандартного внутреннего диаметра 1,0, 2,1 и 3,1 мм с изменяемой скоростью потока от 0,6 до 400 мл/ч для каждого канала. Перистальтическое движение жидкости обеспечивается давлением шести роликов на трубку, прижатую к покрытой тефлоном пластине. Скорость потока можно плавно менять и (что особенно важно) она может задаваться для каждого канала в пределах от 0,6 до 400 мл/ч. Кроме того, можно менять направление потока жидкости. Насос может работать с максимальной и фиксированной скоростью потока.

Различные типы перистальтических насосов выпускает также фирма Technicon. Пропорциональные насосы I и II снабжены 23 трубками различного диаметра. Преимущество данной системы состоит в том, что трубки различного внутреннего диаметра имеют одинаковое сопротивление стенок. Применяются такие насосы с различными целями. Они позволяют вводить пробы заданного объема, добавлять различные реагенты, разбавлять образцы. Собственно прокачивающая часть имеет вид роликов, закрепленных на цепи (рис. 8.6) [42]. Аналогичная система ис-

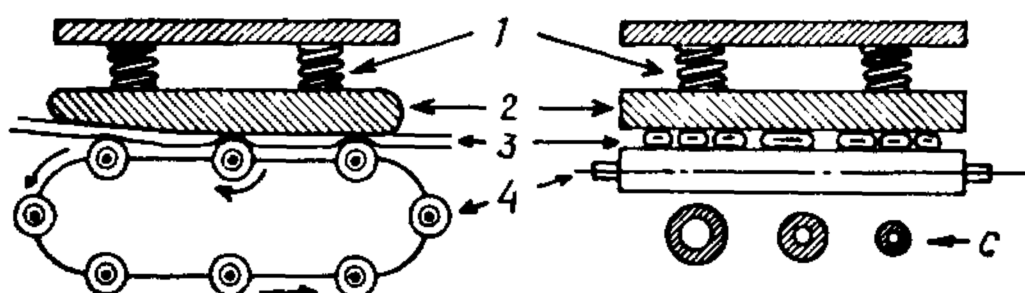


Рис. 8.6. Схема насоса Proportioning Pump (Technicon) [42].
1 — пружины; *2* — прижимные пластины; *3* — капиллярные трубки; *4* — цепь с роликами.

пользуется в перистальтическом насосе фирмы Development Workshops Чехословацкой Академии наук. Он имеет 8 каналов и регулируемую 4-ступенчатую приводную систему.

8.4. СИСТЕМЫ ПРОГРАММИРОВАНИЯ И ФОРМИРОВАНИЯ ГРАДИЕНТА

8.4.1. СИСТЕМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ГРАДИЕНТА

Разделение сложных смесей методом колоночной хроматографии в некоторых случаях удобнее проводить при градиентном элюировании [6, 13, 22а, 37] (см. разд. 1.3.3). В ионообменной хроматографии широко используется программирование потока элюентов и их градиента; в настоящее время этот метод благодаря введенным в последнее время привитым фазам также применяется в жидко-жидкостной хроматографии [3, 20]. Системы формирования градиента, в которых растворители смешиваются при нормальном давлении, относительно недороги и легко изготавливаются.

В некоторых случаях разделение лучше проходит при экспоненциальной форме градиента. Получить такой градиент можно с помощью соответствующей аппаратуры (рис. 8,7, *а*). Один из растворителей помещают в смеситель R_1, снабженный мешалкой *М*, насос *Р* отбирает растворитель из первого сосуда и прокачивает через колонку. Расход растворителя из первого сосуда компенсируется поступлением второго растворителя из

сосуда R_2. Другие типы градиента можно получить, используя два различных сосуда разной формы (рис. 8.7, *в* или 8,7, *д*). Если сечение сосуда R_1 больше сечения сосуда R_2, то формируется градиент вогнутой формы, в противном случае форма градиента выпуклая. Очень удобен градиент линейной формы (сечения обоих сосудов равны). Такой градиент получают при

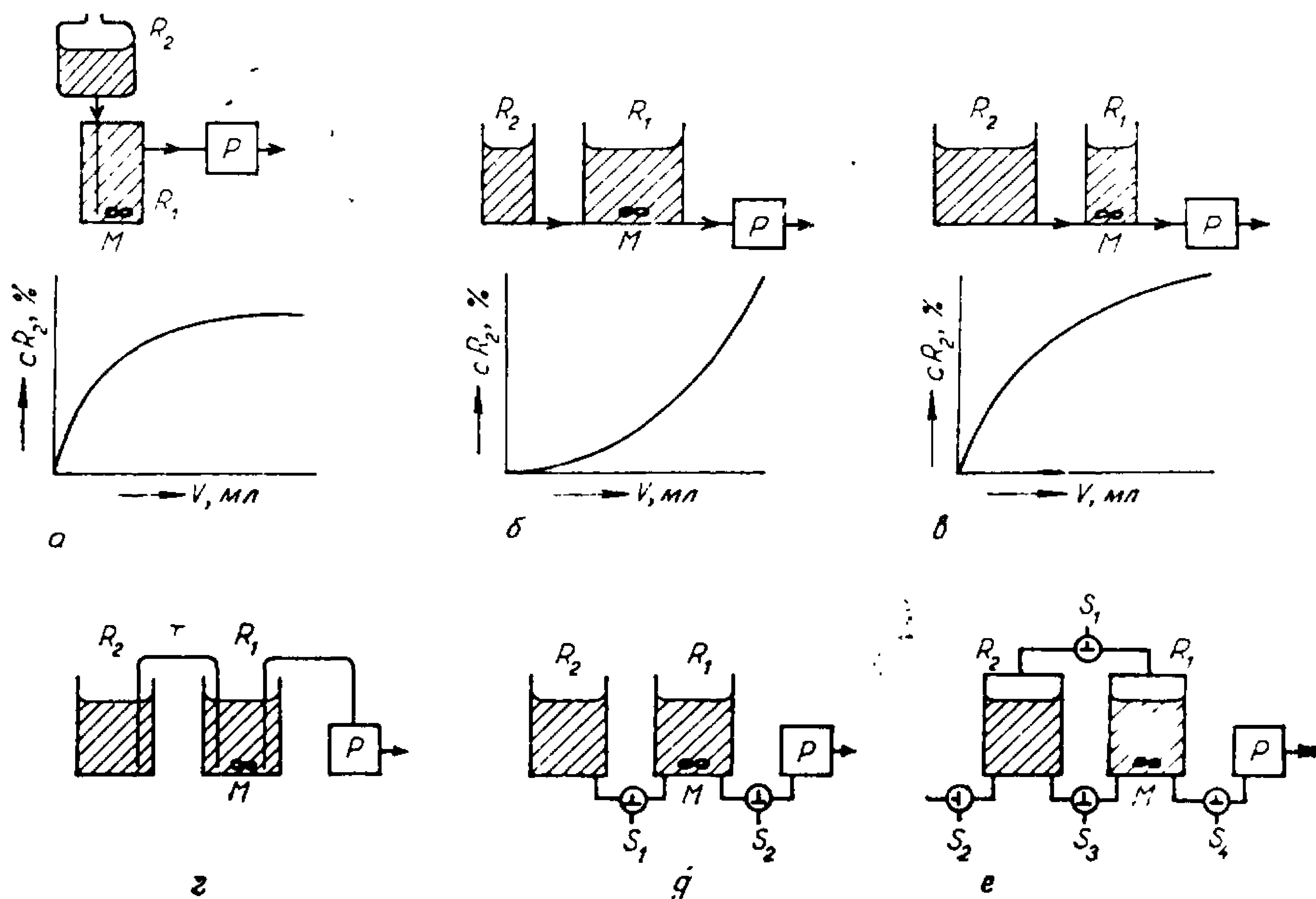


Рис. 8.7. Принцип работы систем формирования градиента.

а — экспоненциальный градиент; *б* — вогнутый градиент; *в* — выпуклый градиент; *г*, *д* — обычная аппаратура для градиентного элюирования; *е* — оборудование для легкого достижения гидростатического равновесия при использовании жидкостей неравной плотности.

M — мешалка; *P* — насос; R_1 — смеситель; R_2 — сосуд с буферным раствором предельной концентрации; S_1—S_4 — трехходовые краны; *T* — соединительные капиллярные трубки; *V* — объем элюента, поступающего из смесителя; cR_2 — концентрация буферного раствора в предельной концентрации в элюирующем растворе, поступившем из смесителя.

смешении растворителей из сосудов R_1 и R_2 одинакового вида, соединенных, как показано на рис. 8.7, *г* или *д*. Иногда лучшие результаты дает устройство типа показанного на рис. 8.7, *е*. Клапаны S_1—S_4 позволяют легче добиться установления гидравлического равновесия обеих жидкостей перед началом градиентного элюирования.

Йонес [17] описал усовершенствованный вариант такой системы. Предложенная им система позволяет добиться хорошей стабилизации колонки и вести элюирование в изократическом режиме (с постоянным составом элюента) с линейным градиентом концентрации буферного раствора и промывать в заключение

колонку ограничивающим буферным раствором (рис. 8.8). Первый буферный раствор помещают в сосуды R_1 и R_2. Сосуды R_3, R_4 заполняют буферным раствором предельной концентрации. Сосуд R_4 снабжен капилляром, уровень жидкости в котором должен быть таким же, как и в градиентных сосудах R_2 и R_3. Уровни буферных растворов в сосудах R_2 и R_3 и гидростатическое равновесие между ними должны регулироваться трехходо-

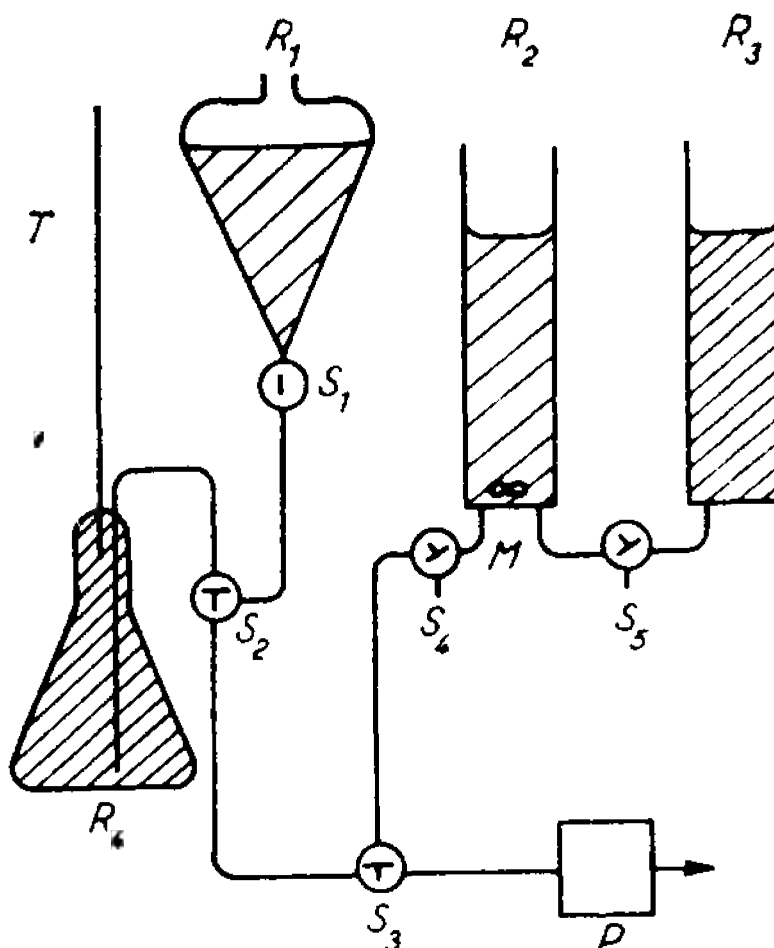


Рис. 8.8. Система для формирования градиента [17].

M — мешалка; *P* — насос; R_1 — сосуд с исходным буферным раствором; R_2 — смеситель, содержащий растворитель; R_3 и R_4 — сосуды для дополнительного буферного растворителя; S_1—S_5 — трехходовые краны; *T* — капиллярные трубки.

выми кранами S_4 и S_5, которые должны находиться в указанной позиции после достижения требуемых условий. Одновременно уровень буферного раствора в капилляре *T* сосуда R_4 должен находиться в гидростатическом равновесии с уровнем растворов в сосудах R_3 и R_4. В процессе стабилизации колонки с первым буферным раствором из резервуара R_1 кран S_1 и трехходовые краны S_2 и S_3, направляющие поток первого буферного раствора в насос, должны быть открыты. Эта позиция и показана на рисунке. В процессе изократического элюирования положения кранов не меняются. В начале градиентного элюирования сосуды R_2 и R_3 соединяются через кран S_5, и все три ввода соединяются краном S_3. Кран S_1 закрывается, и система сосудов R_2 и R_3 соединяется через кран S_4 с насосом. Одновременно сосуд R_4 соединяется с краном S_3 через кран S_2. По окончании градиентного элюирования буферный раствор из сосуда R_4 начинает автоматически поступать в насос. Небольшие количества буферного раствора в капилляре сосуда R_4 не влияют на градиент.

В некоторых случаях предпочтителен более сложный градиент с применением системы из нескольких сообщающихся сосудов (Varian). Например, в жидкостном хроматографе Varian

фирм Hitachi Perkin-Elmer [11] предусмотрено шесть стеклянных сообщающихся сосудов объемом по 200 мл каждый, снабженных мешалками (рис. 8.9), что позволяет более тонко программировать градиент. Девятикамерная система Autograd (Technicon) [40] используется для градиентного элюирования

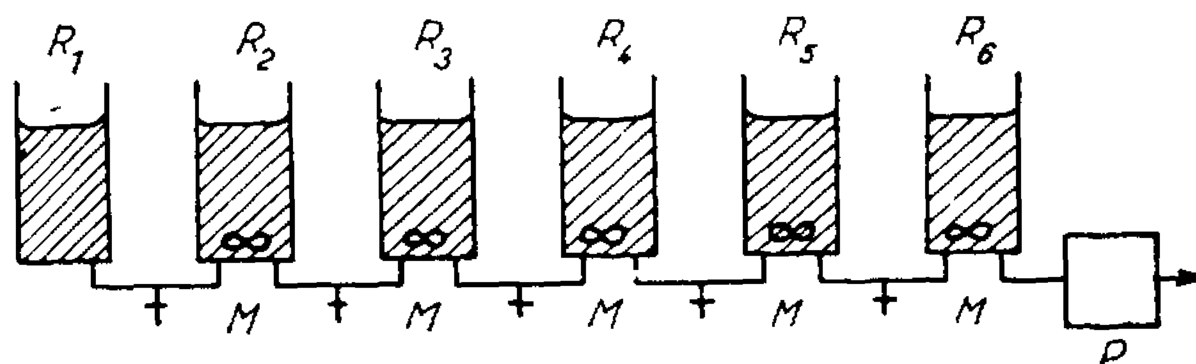


Рис. 8.9. Схема 6-камерного устройства Variant, используемого для получения градиента в хроматографе Hitachi Perkin-Elmer [40].

P — насос; R_1—R_6 — сосуды с различными буферными растворами; *M* — мешалка.

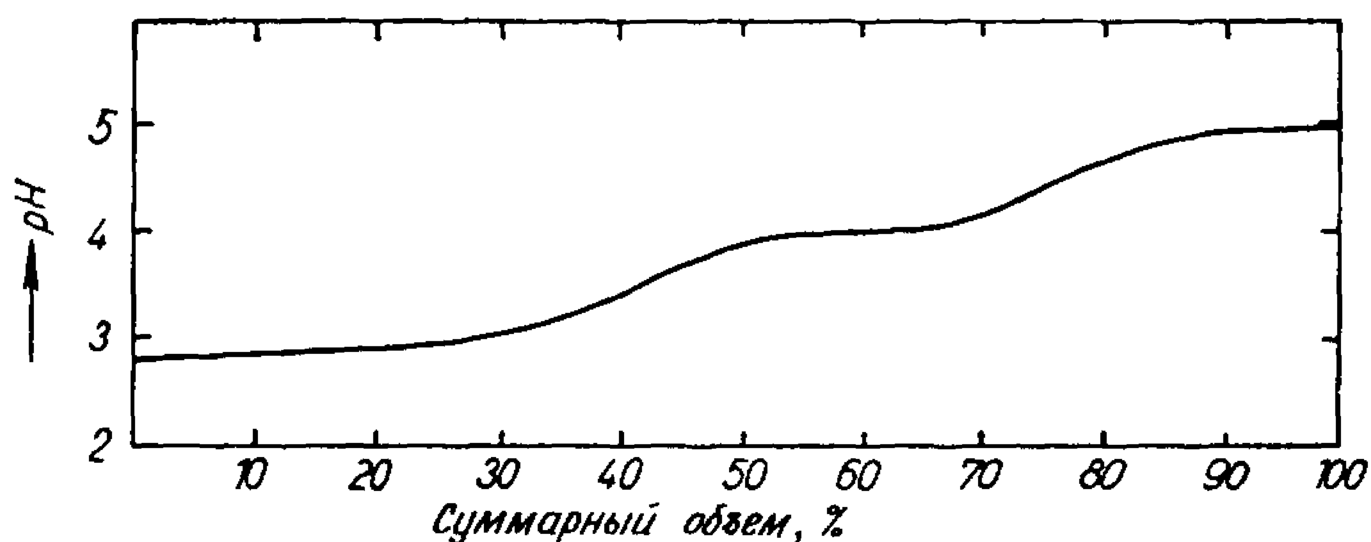


Рис. 8.10. Профиль градиента, формируемого 9-камерным устройством Autograd (Technicon) [40].

Исходный буферный раствор, pH 2,875; конечный буферный раствор, pH 5,00.

на одноколоночном аминокислотном анализаторе. Буферные растворы характеризуются следующими величинами pH: 2,875, 2,875, 2,875, 2,875, 3,10, 3,80, 4,60, 5,00, 5,00. Результирующий градиент показан на рис. 8.10. Фирма Phoenix также выпускает 9-камерный градиентный смеситель Varigrad [28, 30], в котором сосуды снабжены тефлоновыми мембранными кранами и мешалками.

Дальнейшим важным шагом в развитии метода градиентного элюирования явилась разработка новых типов кранов для мгновенного соединения, управляемых электронным модулем. Такие разработки используются в жидкостном хроматографе фирмы Du Pont. В формирователе Varipump фирмы Phoenix результирующий градиент фиксируется на вертикально вращающемся барабане. Он служит для установления ионной силы и градиента pH. Аналогичная система также установлена и в хро-

матографе Ultrograd Gradient Mixer (LKB) [23]. Здесь форма градиента записана на листе границей черного и белого полей, она считывается фотоэлектрическим детектором, связанным с кранами, открывающими доступ в систему из различных сосудов с растворителями (рис. 8.11, *а* и *б*). Таким способом программируемое объемное соотношение обоих компонентов R_1 и R_2 элюирующей системы достигается в результате изменения частоты включения клапанов V_1 и V_2. В смесительной каме-

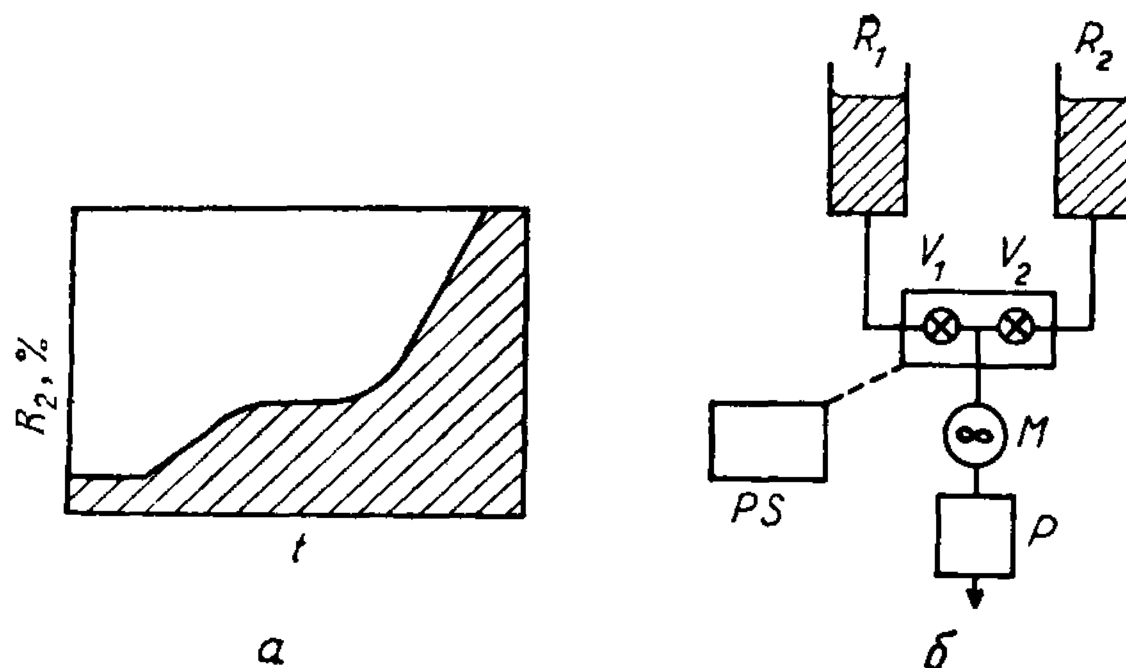


Рис. 8.11. Схема градиентного смесителя Ultrograd Gradient Mixer (LKB) и профиль градиента [23].

а — изменение во времени содержания растворителя R_2 в элюенте, подаваемом из смесителя; *б* — схема смесителя: *PS* — фотоэлектронное сканирующее устройство; *М* — мешалка; *Р* — насос; R_1 и R_2 — сосуды с буферными растворами; V_1 и V_2 — клапаны.

ре *СК* происходит полная гомогенизация смеси, и полученный раствор прокачивается через колонку. Такое оборудование позволяет, используя соответствующий контрольный график, программировать градиент любой формы и любого типа. Некоторые градиентные устройства фирмы LKB обеспечивают автоматическую обратную связь, которая включается в тот момент, когда сигнал самописца (поглощение) достигает определенного значения, например при появлении пика определенного размера. В этом случае формирование запланированного градиента замедляется и элюирование продолжается в изократическом режиме до тех пор, пока поглощение не снизится ниже заданного уровня, после чего элюирование продолжается в соответствии с запланированной формой градиента.

Другой принцип формирования градиента связан с применением двух или более насосов. На рис. 8.12 показана схема используемого для получения линейного градиента многоканального перистальтического насоса Р3 фирмы Pharmacia с соответствующим вспомогательным оборудованием. Скорость потока, протекающего через один капилляр, может меняться в пределах от 0,6 до 400 мл/ч. Устройство с градиентом давления обыч-

но контролируется программным модулем, управляющим насосами так, чтобы создавался планируемый градиент. Компоненты смеси поступают в смесительную камеру, которая должна быть достаточно мала и должна обеспечивать полное их смешение. Обычно используется двухкомпонентный градиент. На практике принято обозначать начальный компонент как раствор А, а добавляемый компонент (более высокой концентрации) как раствор Б. Графически градиент изображается в виде зависимости содержания компонента Б (ордината) от длительности гра-

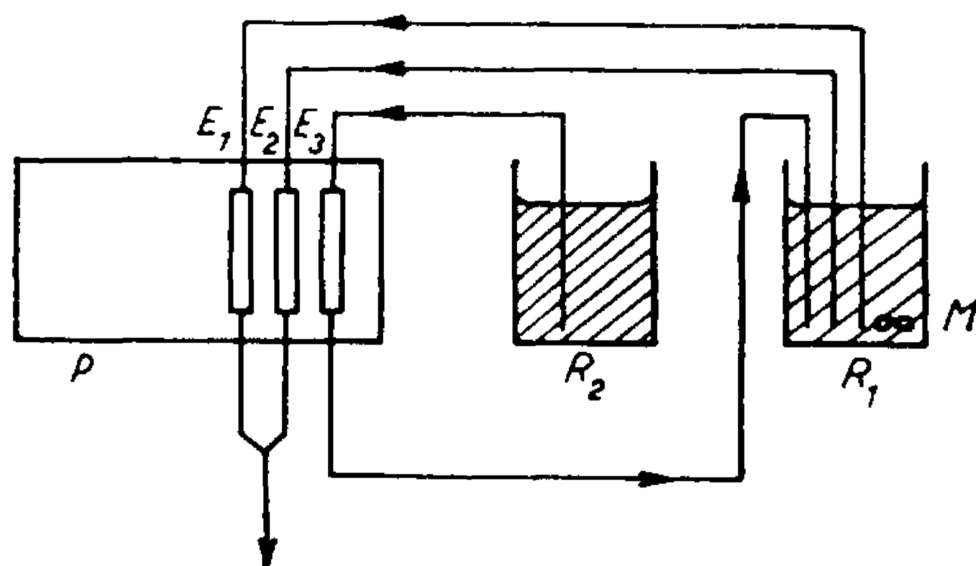


Рис. 8.12. Схема перистальтического насоса P3 (Pharmacia) для формирования линейного градиента [29].

E_1 — E_3 — эластичные трубки равного диаметра; M — мешалка; P — перистальтический насос; R_1 и R_2 — сосуды с буферными растворами.

диентного элюирования (абсцисса). Конструкторское бюро Чехословацкой Академии наук выпускает аппаратуру для формирования градиента Proportional pump 68 000. Жидкость перекачивается из сосудов двумя плунжерными насосами. В процессе работы поддерживается постоянная суммарная скорость потоков, которая обеспечивается тем, что, когда в процессе градиентного элюирования ход поршня одного насоса уменьшается, ход поршня другого насоса увеличивается. Жидкость проходит через смесительную камеру, и таким образом достигается постепенное изменение состава. Работа насосов такого типа определяется контрольным двухцветным графиком, где граница цветов определяет профиль градиента, график наложен на программный цилиндр контрольного устройства. Такая аппаратура пригодна для выбора оптимального состава подвижной фазы, поскольку выбранные рабочие условия легко воспроизводимы для данной системы и позволяют находить оптимальные условия для разделения определенной смеси.

Для получения градиента в хроматографе Nester-Faust, модель 1200, используется электронный контроль скорости перемещения каждого поршня, причем каждый поршень прокачивает отдельный растворитель [10]. Такая система (рис. 8.13) при-

меняется при очень больших давлениях. Аналогичное устройство введено и в аминокислотный анализатор [21], который работает при средних давлениях. В хроматографе фирмы Du Pont, модель 830, с однонасосным градиентным устройством применяется соединение, показанное на рис. 8.14. Форма градиента зависит от работы двух соленоидных клапанов V_1 и V_2, которые открываются поочередно на запрограммированные промежутки времени. Насос P либо прокачивает растворитель из сосуда R_1 через клапан V_1 в смесительную камеру, либо выдавливает первым растворителем второй из резервуара R_2 через клапан V_2

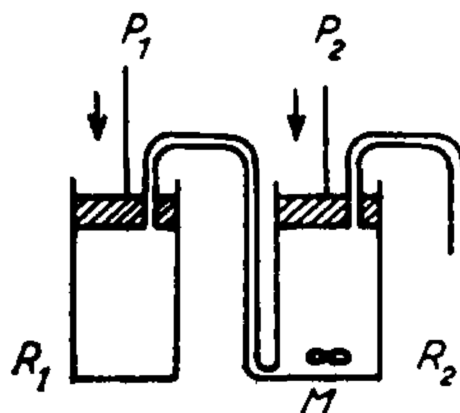


Рис. 8.13. Схема устройства для формирования градиента, используемого в хроматографе фирмы Nester-Faust [10].

М — мешалка; P_1 и P_2 — программно управляемые поршни; R_1 и R_2 — сосуды с растворителями.

(спиральная трубка содержит до 150 мл растворителя). Прибор работает при давлениях до 210 атм и является отдельной частью хроматографа. При использовании линейного градиента весь диапазон от чистого растворителя А до чистого растворителя Б может быть пройден за 10 мин. Длительность работы программы можно увеличить в результате наложения отдельных программ до 100 мин. Помимо линейного градиента можно выбрать программу, определяющую экспоненциальный градиент и четыре вогнутых или выпуклых формы градиента (рис. 8.14, б). Выбор оптимального состава смеси растворителей существенно упрощен; с этой целью на шкале устанавливают требуемые концентрации компонента Б (30, 40, 50, 60 и 70%), и необходимый состав будет получен уже через 4 мин.

Программатор модель 660 (Waters) контролирует работу одного или двух насосов Solvent Delivery System модели 6000. Время выполнения градиента может меняться от 1 мин до 10 ч. Начальная и конечная концентрация, а также скорость потока смеси компонентов А и Б (мл/мин) задаются в цифровой форме (в виде процентного содержания компонента Б). Можно выбрать одиннадцать стандартных программ, среди которых экспоненциальный градиент соответствует типам от n^2 до n^5 и от $\sqrt{n}$ до n. После завершения цикла все операции могут быть выполнены в обратном порядке и может быть проведена стабилизация колонки растворителем исходного состава. Кроме того, для изократического режима хроматографирования может программироваться скорость элюирования. Программатор обеспечивает длительное хранение программ. На выходной хромато-

грамме отмечается параллельно с выходной кривой состав растворителя и скорость потока.

В этой книге не дается метода расчета градиентов. Состав элюента при линейном градиентном элюировании легко рассчитать по параллелограммам, которыми форма градиента представлена на выходной ленте самописца (хроматограмме). Под-

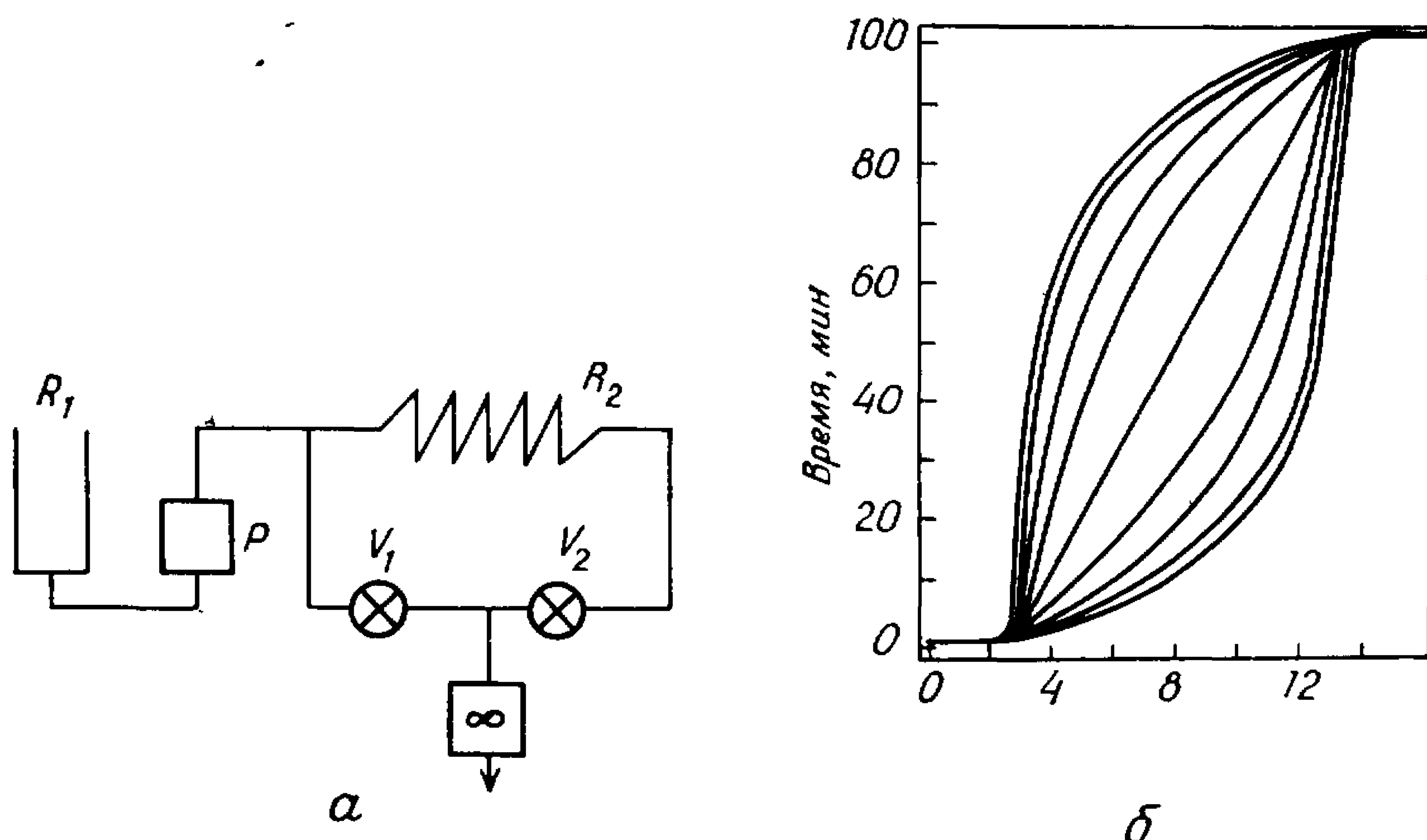


Рис. 8.14. Схема устройства для формирования градиента, используемого в хроматографе фирмы Du Pont, и профили градиента [6].

а — схема устройства: *М* — мешалка; *Р* — насос; R_1 — емкость с буферным раствором; V_1 и V_2 — клапаны; *б* — профили градиентов.

борку уравнений для расчета других типов градиента можно найти в обзорных статьях, например [25, 26], или в монографии Литеану и Гокана [22а].

8.4.2. ПОЛНОЕ ПРОГРАММИРОВАНИЕ

Программно управляемое выполнение операций отдельными блоками аппаратуры является необходимым условием автоматизации, и в последнем разделе о градиентном элюировании мы рассмотрим некоторые примеры такого управления. В простейшем случае сигналы, управляющие работой отдельных функциональных единиц хроматографа (насосов, кранов, регуляторов температуры), задаются механическим замыканием контактов по периметру диска, вращаемого мотором с постоянной скоростью. При программировании однофункциональной работы градиентного программатора можно использовать описанный выше график, который считывается фотоэлектрическим детектором, формирующим аналоговый сигнал по определенным графиком условиям. Циклическая работа аппаратуры программируется петле-

образным датчиком программы. В программаторе фирмы Technicon используется петлеобразная гибкая лента типа киноленты. Ее легко перфорировать требуемым образом и, таким образом, задать программу требуемого вида. В процессе перемещения ленты через приемник головка микропереключателя входит в перфорацию и формирует электрический сигнал управления другими модулями хроматографа, например переключение перистальтического насоса на следующий шаг. Длина петли выбирается в соответствии с длительностью аналитического цикла, в течение которого необходимо сформировать несколько импульсов управления.

В некоторые хроматографы вмонтированы системы отсчета времени, работающие с синхронизирующей частотой, так что в любой момент можно установить, сколько времени прошло с начала процесса. В некоторых случаях опорная частота стабилизована кварцевым генератором. Ряд временных переключателей обычно подключен к системе отсчета времени, каждый из них управляет отдельной функцией хроматографа. Такая система программируется стандартной кассетой с определенным числом контактов. Кассеты содержат определенную аналитическую программу, и их можно заменять в соответствии с выбранной аналитической методикой. На отдельном лимбе устанавливается время, в которое должна быть включена определенная отдельная функция хроматографа. Специальные типы кассет осуществляют полный контроль и автоматически вырабатывают импульсы для компьютера. Некоторые программируемые системы работают с многодорожечными типами гибких лент и являются частью стандартного оборудования ряда хроматографов. Их основное преимущество — легкость выбора программ. Дальнейшее усовершенствование программаторов привело к появлению аппаратуры, в которой объединены программатор, автоматический контроллер функций хроматографа и компьютер; вводимые рабочие параметры преобразуются в цифровую форму и индицируются на контрольной панели.

В большинстве последних разработок для полного контроля системы и упрощения последующей обработки результатов применяются микропроцессоры.

8.5. АППАРАТУРА ДЛЯ ВВОДА ОБРАЗЦА, ШПРИЦЫ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ КОЛОНКИ

8.5.1. СИСТЕМЫ ВВОДА ОБРАЗЦА И ШПРИЦЫ

В полианализаторе фирмы Technicon для ввода пробы смесей аминокислот предусмотрен специальный диск, подобный круговому коллектору фракций. На этом диске по его периметру

расположены 80 держателей в виде пластмассовых патронов. В них помещены небольшие колонки с ионообменником в H^+-форме, в которые введены образцы исследуемых смесей. Колонки закрыты с обеих сторон пористыми прокладками. После каждого поворота диска колонки с одинаковыми образцами перемещаются между вводом буферного раствора и головкой колонки. Все части сжимаются друг с другом, и такое соединение выдерживает давление 28—35 атм. Вместе с потоком буферного раствора образец поступает в колонку. Колонки с

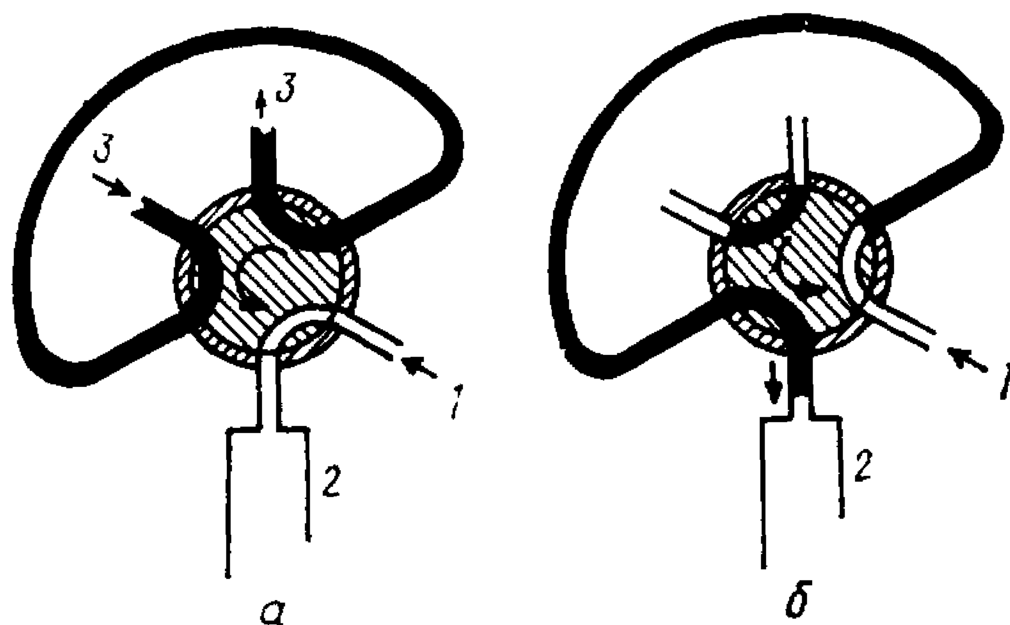


Рис. 8.15. Шестиходовой кран с петлей для образца.
а — заполнение петли образцом; *б* — перевод образца в колонку; *1* — элюент; *2* — колонка; *3* — образец.

ионообменником можно использовать повторно. Адсорбированные аминокислоты, включая метионин и тирозин, в таких условиях не разлагаются. Для серийных анализов с коротким рабочим циклом с успехом применяется устройство для ввода пробы фирмы Technicon, с помощью которого можно подавать в колонку до 200 жидких образцов. Эти образцы помещаются в пластмассовые сосуды на круглом диске. Через определенные интервалы автоматический сифон отбирает требуемый объем образца из пробирок и вводит его в аналитическую часть прибора. По окончании этой операции диск сдвигается на одну позицию, и аппаратура снова готова к забору следующего образца. В другом методе ввода пробы постоянного объема в колонку используется петля из тефлонового капилляра. Поскольку объем петли не меняется, при таком способе ввода не требуется точно измерять объем вводимого образца. Образец вводится в капилляр шприцем, и объем образца ограничен объемом петли, закрепленной в кране-переключателе. Обычно это шестиходовой кран [35]. Принцип работы такого крана показан на рис. 8.15. В первой позиции (рис. 8.15, *а*) капилляр заполняется пробой. Далее кран поворачивается на 60° (рис. 8.15, *б*), и в этой позиции образец вводится в колонку потоком буферного раствора.

Таким образом, в момент ввода образца проходящий через хроматографическую систему поток не прерывается. Фирма Durrum поставляет шестиходовые краны высокого давления для ввода образца, работающие при давлениях до 70 атм. В этих кранах нержавеющая сталь 316 заменена на сплав карпентер 20, который имеет еще лучшие свойства, и использован наполненный

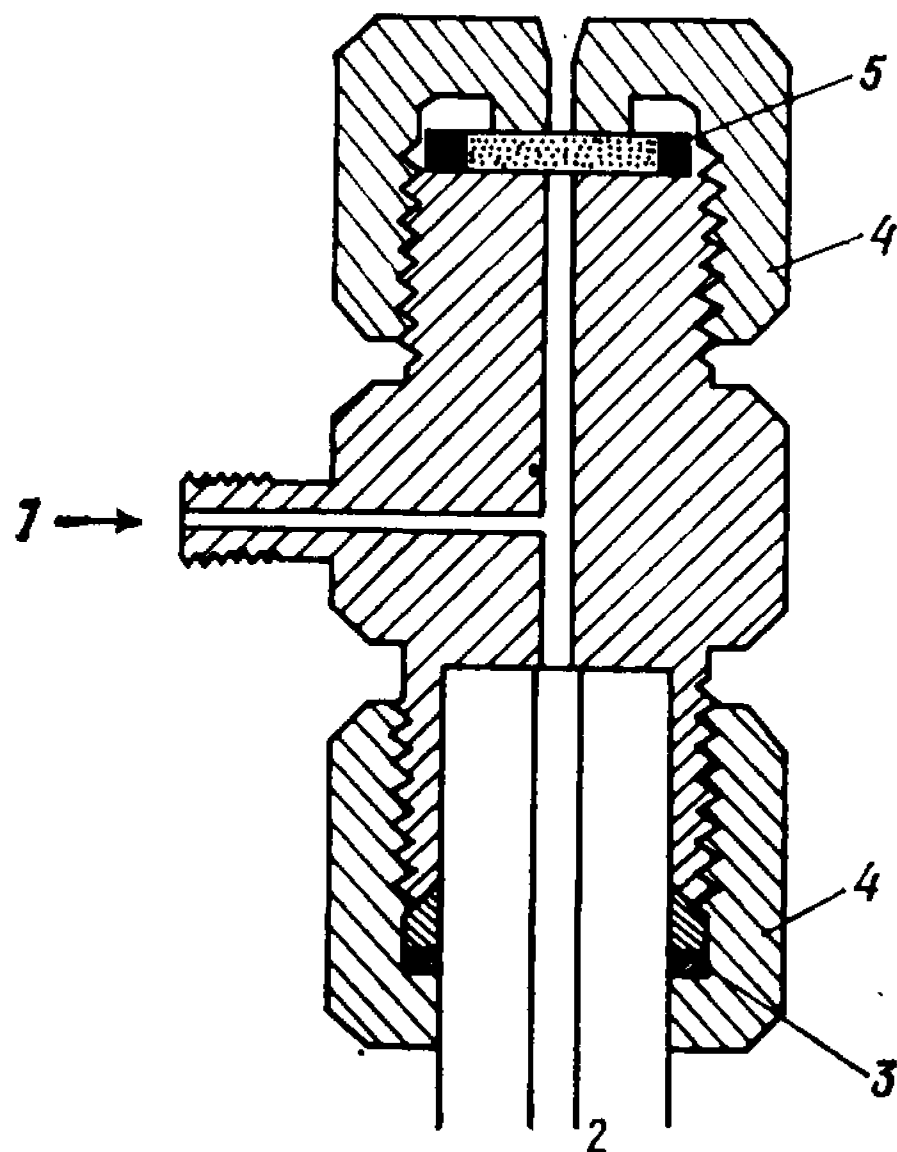


Рис. 8.16. Колонка с системой ввода.

1 — элюент; 2 — колонка; 3 — уплотнение; 4 — гайка; 5 — прокладка.

керамикой тефлон. Минимальный объем вводимой пробы составляет 10—12 мкл; объем вводимого образца может меняться при изменении длины капилляра. Такие краны легко переключаются или управляются автоматически. Разработаны краны, работающие при давлениях до 350 атм [35]. Фирма Micrometrics поставляет устройства для ввода микропроб объемом 1, 2, 4 и 8 мкл. Петля для ввода такого образца показана на рис. 8.3.

В других системах образцы помещаются в тефлоновых капиллярах, навитых на форму в виде вертикальной спирали или расположенных в виде двухслойной горизонтальной спирали. В этих капиллярах пробы защищены от воздействия кислорода воздуха и бактерий. Автоматические анализаторы содержат несколько таких капилляров. Например, фирма Beckman выпускает устройство для ввода проб (модель 121) 72 образцов; все образцы помещены в общий холодильник и хранятся при 4 °С.

Из капиллярных резервуаров образцы вводятся насосом в мерную капиллярную трубку на шестиходовом кране. Ошибка при таком способе ввода пробы составляет примерно 1%. При работе с маленькими аналитическими колонками используется устройство для ввода пробы, показанное на рис. 8.16. Образец объемом в несколько микролитров вводится непосредственно в колонку при помощи шприца (например, фирмы Hamilton). Игла прокалывает прокладку и вводится до тех пор, пока не коснется фильтра, расположенного непосредственно перед упаковочным материалом [4]. Прокладка (септум) изготавливается из силиконовых полимеров типа буна N, витон или EPR. Неплохие результаты дает использование прокладки из неопреновой резины, усиленной найлоновым кордом и покрытой тефлоном. Для высоких давлений вплоть до 420 атм разработаны специальные шприцы, например Hamilton HP-305N и Precision Sampling B-110. Если наполнитель в колонке закрыт с обеих сторон пористыми пробками, образец вводят непосредственно на входной фильтр. Образец поступает в колонку под воздействием потока подвижной фазы. В хроматографах, выпускаемых фирмами Hewlett-Packard, Packard-Becker и Siemens, используется новая методика ввода образца; они снабжены специальным устройством для ввода пробы без септума.

8.5.2. ТИПЫ СОВРЕМЕННЫХ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ КОЛОНОК

Типы и размеры колонок меняются в зависимости от условий анализа и свойств упаковочного материала. Точно контролируемая температура разделения улучшает воспроизводимость. Поэтому колонки помещают в рубашку с циркулирующей водой или, если колонки небольшие, в водяную баню или даже в печь с циркулирующим горячим воздухом.

В классической жидкостной хроматографии, как правило, применяют колонки диаметром 8—12 мм. По практическим соображениям длина их составляет обычно 50—100 см, а внутренний диаметр определяется физическими параметрами адсорбентов. Диаметр аналитических колонок равен 1—6 мм [39]. Если рабочее давление не превышает 70 атм, обычно предпочтительны стеклянные колонки. Если рабочее давление близко к указанному, то стеклянные колонки помещают в рубашки из нержавеющей стали. Для очень высоких давлений используются колонки из нержавеющей стали с точно выдержанным диаметром. Обычно они имеют форму трубки, но эксперименты показали, что трубки можно свертывать в спираль или сгибать, поскольку эффективность колонок при этом не снижается. Такие колонки следует упаковывать суспензионным методом. Сорбент

с частицами размером 5—10 мкм упаковывают суспензионным методом в колонки длиной 15—50 см. Такие колонки более эффективны, но гидродинамическое сопротивление у них значительно выше. Колонки, используемые для автоматических анализов, в настоящее время наиболее унифицированы [8]. Различные фирмы стандартизовали диаметры колонок, в частности ко-

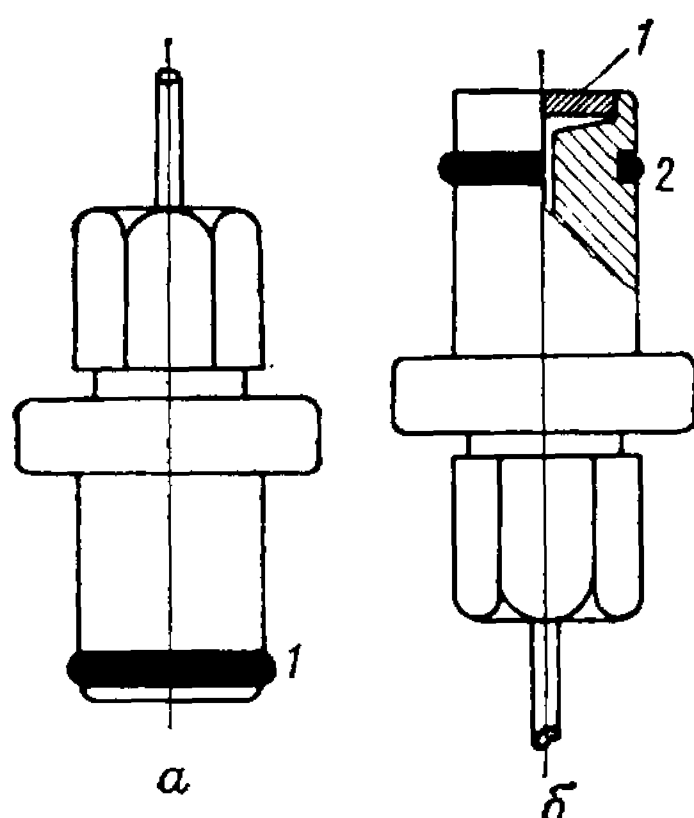


Рис. 8.17. Уплотняющий наконечник колонки.

а — верхняя часть; *б* — нижняя часть; *1* — кольцо из неопрена; *2* — диск из пористого тефлона.

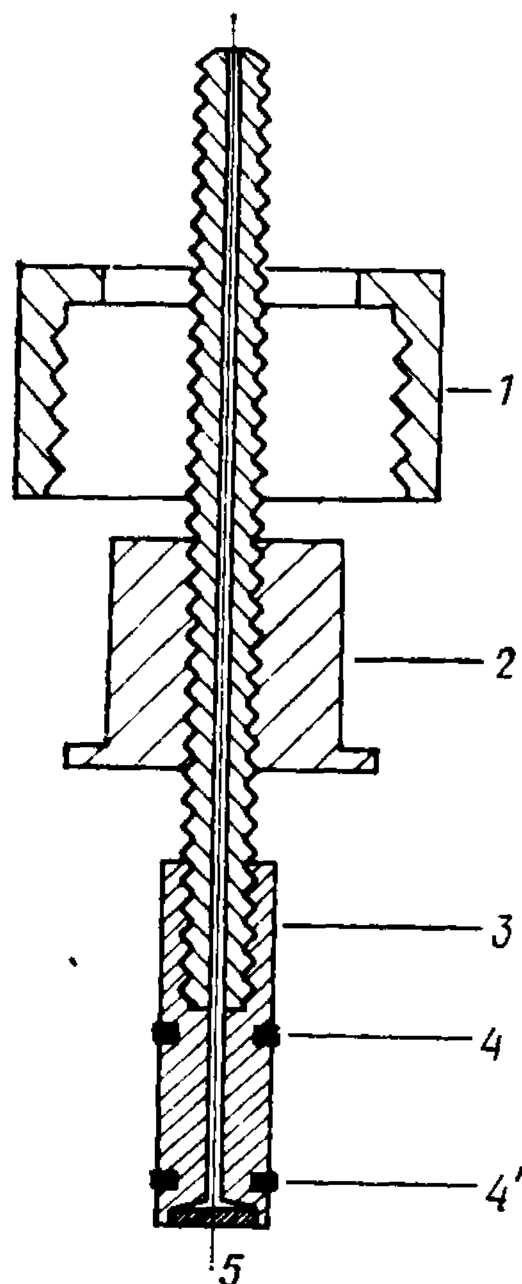


Рис. 8.18. Выдвижной наконечник колонки.

1 — гайка рубашки колонки; *2* — вращающаяся гайка; *3* — тефлоновый поршень; 4_1 и 4_2 — уплотняющие кольца; *5* — диск из пористого тефлона.

лонок, помещаемых в рубашки. Современная технология позволяет изготавливать стеклянные колонки с точно выдержанными внутренними диаметрами обычно 4, 6, 9, 12 или 25 мм и длиной 150, 300, 600 или 1000 мм. Очень часто колонки снабжены уплотненными рубашками, верхние и нижние концевые соединения колонок идентичны и имеют внешнюю резьбу.

Хроматографические колонки конструируют так, чтобы мертвый объем был минимальным. В простейшей модификации положение уплотнений на обоих концах колонки — верхнем и нижнем — фиксировано. Эти уплотнения обычно выполнены из тефлона и снабжены канавкой для пластмассового кольца, которое помещают вплотную к стенкам колонки (рис. 8.17). Некоторые уплотнения выполнены так, чтобы окончательная регулировка проводилась одновременным обжимом с обеих сторон и чтобы колонка сразу уплотнялась полностью. Внизу колонки помеща-

ют фильтр, который препятствует вымыванию адсорбента и обеспечивает равномерный поток элюента. Фильтр выполнен из пористого тефлона с определенным размером пор, позволяющим удерживать адсорбент с частицами размером до 5 мкм (Hamilton). Иногда используются фильтры из пористого стекла или для очень высоких давлений — фильтры из нержавеющей стали. В некоторых случаях в колонку помещают пористые металлические диски (фритты), также не пропускающие частицы размером до 5 мкм (Hamilton).

В некоторых типах колонок высоту слоя адсорбента можно по желанию менять. Диаметры ввода и вывода у таких колонок одинаковы (рис. 8.18), и поршни с пористым диском можно перемещать на расстояние до примерно 10 см. Система концевых соединений обеспечивает закрепление тефлоновых капилляров как на вводе в колонку, так и на выводе из нее. Некоторые фирмы поставляют колонки из нержавеющей стали, предназначенные для хроматографии при высоких давлениях, уже заполненные адсорбентом, закрепленным двумя фильтрами также из нержавеющей стали. Подключают их к гидравлической системе с помощью металлических капилляров.

8.5.3. УПАКОВКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ КОЛОНОК

Развитие хроматографии привело к преимущественному использованию сорбентов с одинаковым размером частиц и с диаметром частиц меньше 10 мкм. Некоторые адсорбенты такого типа можно упаковывать в колонку в сухом состоянии. Чтобы слой адсорбента был однородным, колонку закрывают снизу и помещают в установку для упаковки. В процессе заполнения колонка перемещается вверх — вниз с требуемыми амплитудой и частотой. Сверху на колонку помещают воронку, в которую из сосуда с узким выводным отверстием подается адсорбент.

Некоторые адсорбенты вводят в колонку в виде суспензии. Поскольку скорость осаждения маленьких частиц очень мала, можно использовать динамический метод упаковки. Суспензию помещают в резервуар, и подаваемый под давлением элюент продавливает ее в колонку, скорость потока элюента должна быть больше скорости осаждения частиц. Эксперименты показали, что удобнее всего при заполнении пользоваться U-образной трубкой, одно колено которой служит резервуаром для суспензии частиц и жидкости адсорбента, а второе колено подсоединяется к заполняемой хроматографической колонке, так что суспензия поступает в нее снизу. В некоторых случаях колонки заполняют следующим образом. Суспензию загружают в цилиндрический сосуд (диаметр которого несколько больше, чем

у воронки) и выдавливают в колонку, подсоединенную к этому сосуду снизу. Методы упаковки колонок подробно рассматриваются в литературе [19, 27, 34, 36].

8.6. ДЕТЕКТОРЫ

Оценка результатов хроматографического разделения путем анализа отдельных фракций — процедура относительно медленная, однако очень часто только таким методом можно получить важную специфическую информацию, а если анализируются радиоактивные материалы, то и повысить чувствительность обнаружения. Чаще всего используется автоматическая регистрация процесса разделения детектором, дающим на выходе электрический сигнал, интенсивность которого пропорциональна концентрации анализируемого соединения. Этим же методом можно провести количественное определение. Обнаружение соединений в жидкостной хроматографии проводится различными способами. Многие детекторы оценивают различие в характеристике анализируемого соединения и элюента. В частности, этот принцип положен в основу спектрофотометрического детектирования в ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной областях. Детекторы неселективного действия измеряют показатели преломления, проводимость или диэлектрическую проницаемость при тщательной температурной компенсации рабочей ячейки и ячейки сравнения. В некоторых типах детекторов растворитель перед вводом соединения в регистрирующий блок удаляется (например, пламенно-ионизационный детектор с подвижной нагреваемой лентой). Конструкция спектрофотометрических детекторов для высокоэффективной жидкостной хроматографии (особенно ультрафиолетового абсорбционного и рефрактометрического детекторов) хорошо разработана. Если для работы с одной колонкой объединяют два детектора, то сначала устанавливают УФ-детектор, а затем рефрактометрический детектор.

Какой бы принцип детектирования ни использовался, объем жидкости между выводом из колонки и вводом в ячейку детектора всегда должен быть минимальным. Поскольку с увеличением объема проточной ячейки детектора чувствительность обнаружения возрастает, а разрешение ухудшается, то обычно выбирают оптимальный вариант. В литературе описана конструкция проточных ячеек двух типов — Z- и H-типа [9, 14]. Чувствительность прибора увеличивают многими способами, но при этом всегда используют различие в свойствах элюента и элюата. С помощью разного рода усилителей можно значительно увеличить отношение полезного сигнала к шуму.

Спектрофотометрические методы обеспечивают высокую степень селективности и чувствительности. Они не слишком сильно подвержены влияниям изменения температуры или скорости потока. В двухлучевом приборе луч определенной длины волны расщепляется полупрозрачным зеркалом на два луча, один из которых проходит через сравнительную ячейку, а второй — через рабочую, после чего оба луча фокусируются на фотоячейке. Для того чтобы установить линейное соотношение между выходным сигналом фотоячейки и концентрацией вещества, выходные сигналы

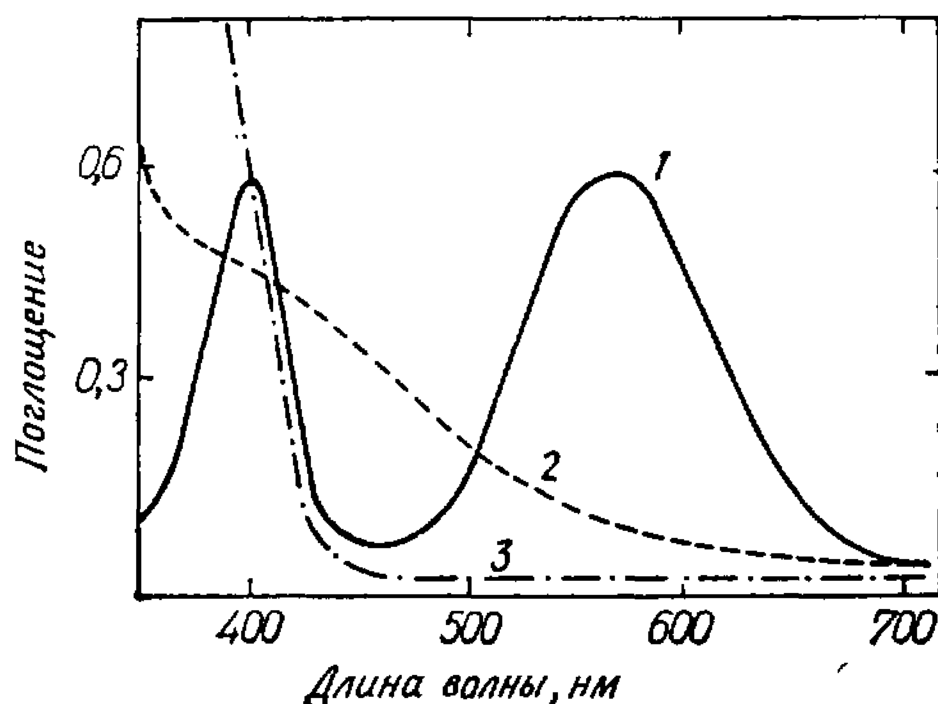


Рис. 8.19. Спектры соединений, образующихся при реакции аминокислот с нингидрином.

1 — продукты реакции основных аминокислот; 2 — продукты реакции пролина; 3 — нингидрин.

фотоэлементов рабочей и сравнительной систем проходят через логарифмический усилитель. Разность между полученными значениями вновь усиливается, и сигналы регистрируются самописцем.

Преимущество двухлучевых приборов состоит в том, что ошибки, вызванные изменениями источника излучения и поглощения растворителем, минимальны.

Большинство соединений не поглощает в видимой области спектра. Поэтому анализаторы снабжаются прибором, который вводит в поток элюата постоянное количество реагента, воспроизводимо реагирующего с анализируемым соединением. Продукты реакции обнаруживаются на различных длинах волн. Именно к этому типу детекторов относятся аминокислотные анализаторы, в которых в поток элюата вводят нингидрин. Большинство аминокислот дают с нингидрином окрашенные соединения; спектры их поглощения показаны на рис. 8.19. Спектр поглощения продуктов реакции пролина отличается по положению максимума. При проведении количественного анализа боль-

шинства аминокислот спектр поглощения продуктов их взаимодействия с нингидрином снимают при 570 нм, а спектр продуктов реакции с пролином — при 440 нм. Для автоматической стабилизации нулевой линии дополнительно измеряют поглощение при 690 нм. В более поздних моделях аминокислотных анализаторов (например, LKB — Biocal) с одной проточной ячейкой предусмотрено измерение поглощения при 440 и 570 нм. Вращающийся диск с отверстиями генерирует пульсирующий световой луч с длинами волн 440 и 570 нм с частотой 300 Гц. Этот луч проходит через полупрозрачное зеркало к фотоумножителю. Одновременно к фотоумножителю направляется сравнительный поток света (с длиной волны 570 нм); этот луч не проходит через измерительную ячейку. Выходной сигнал с фотоумножителя идет через прерыватель, далее он усиливается и линеализируется. Энергия фотоисточника стабилизована фотосопротивлением. Выходной сигнал детектора находится в интервале от 0 до 50 мВ, детектор имеет пять диапазонов (0—2; 0—1; 0—0,5; 0—0,2; 0—0,1) единиц поглощения. Для регистрации используется двухперьевой самописец.

В настоящее время в наиболее чувствительных приборах предпочитают использовать электронное усиление сигнала, так как увеличение оптического пути, длины измерительной ячейки, приводит к увеличению шума нулевой линии и затрудняет идентификацию соединений, поступающих из колонки. Чтобы можно было проводить постоянное измерение поглощения, в некоторых приборах, например фирмы LKB, предусмотрено автоматическое изменение масштаба при достижении самописцем конца шкалы. Практически это означает, что можно записать поглощение, втрое превышающее установленный диапазон. Это весьма ценно, но само собой разумеется, что при этом используется очень качественный самописец со стабильной нулевой линией. Автоматическая аппаратура, подобная аминокислотным анализаторам, применяется для анализа карбоновых кислот. В этом случае реагентом служит бихромат калия, а поглощение раствора измеряется при 424 нм [49]. Разработана также методика автоматического обнаружения продуктов реакции жирных кислот и *о*-нитрофенолята натрия; окраска образующихся соединений регистрируется при 350 нм [18].

Чаще всего регистрацию соединения в потоке в жидкостной хроматографии, особенно при градиентном элюировании, проводят с помощью УФ-спектрофотометра обычно при 254 или 280 нм. Этим способом удается обнаруживать нанограммовые количества соединений. Источником света длиной волны 280 нм служит ртутная лампа низкого давления, а линия в 254 нм используется для инициирования флуоресценции при 280 нм. Излучение с длиной волны 254 нм применяют для обнаружения

аминокислот, тогда как белки обнаруживают при 280 нм. Органические кислоты дают максимум поглощения при 200—210 нм. Фирма Jeol использует УФ-детектор, работающий при длине волны 215 нм. Чувствительность такого обнаружения понижена, если анализируются насыщенные кислоты с небольшим числом углеродных атомов, но, если анализируются кетокислоты и ненасыщенные кислоты, чувствительность обнаружения очень высока. Дифференциальный УФ-анализатор UVD 254 (разработки КБ Чехословацкой Академии наук) работает в областях 0—0,5, 0—1,0 и 0—2,0 единиц поглощения, длина ячейки составляет 10 мм, а дрейф нулевой линии равен 4% за 12 ч при 254 нм. УФ-детектор LDC (модель 1522, фирма Jobling) работает при 254 и 280 нм, длина оптического пути составляет 3 мм, выход линейный с диапазонами 0—0,1—0,25—0,5—1,0. Минимальный уровень обнаружения соответствует 0,002 ед. погл. Самописец, УФ-лампа и электронная часть выполнены в одном блоке. У фотометра фирмы Du Pont следующие характеристики: минимальный уровень обнаружения 0,0002 ед. погл. при 254 нм; сдвиг на 0,001 ед. погл. за 1 ч; диапазоны 0,01—0,02—0,04—0,08—0,16—0,32—0,64—1,28—2,56; отклик детектора линеен с точностью до 1%.

Выпускается ряд других детекторов, например «Variscan» (фирмы Varian), который работает в диапазоне от 210 до 780 нм с уровнем шума $5 \cdot 10^{-4}$ ед. погл. Аналогичный прибор выпускается фирмой Hitachi Perkin-Elmer со спектрофотометром на дифракционной решетке. Трехканальная система работает в области 200—700 нм. В хроматографах других типов поток элюента через кювету можно периодически останавливать и снимать полный спектр вещества, находящегося в детекторе с автоматической регистрацией. В последнее время появились безэлектродные высокочастотные газоразрядные лампы, наполненные газом при низком давлении. Такие лампы позволяют проводить измерения в области ниже 210 нм и содержат точечный источник света высокой интенсивности. Они использованы в приборе «Uvicord» (LKB). При хорошей температурной стабилизации сдвиг нулевой линии составляет только 0,005 ед. погл. за 24 ч. Этот прибор является двухлучевым абсорбциомером с длинами волн 206, 254, 280, 340 и 364 нм, при которых обычно проводится обнаружение различных групп биологически важных соединений. Регистрируемые значения записываются или в единицах поглощения, или в процентах пропускания. Измерения проводятся на двух ячейках, одна из которых содержит стандартный раствор, другая — анализируемый, при двух длинах волн одновременно. При 206 нм измеряют поглощение относительно низкомолекулярных неароматических пептидов и некоторых сахаридов. Область поглощения соответствует интервалам

0—0,2 (80—100%-ное пропускание) или 0—1 (0—100%-ное пропускание). Если при работе в первой области коэффициент поглощения достигает величины, большей 0,2, прибор автоматически переключает диапазоны. Когда поглощение достигает некоторой заранее выбранной величины, прибор может выработать специальный сигнал, что полезно для проверки других приборов, например градиентного смесителя.

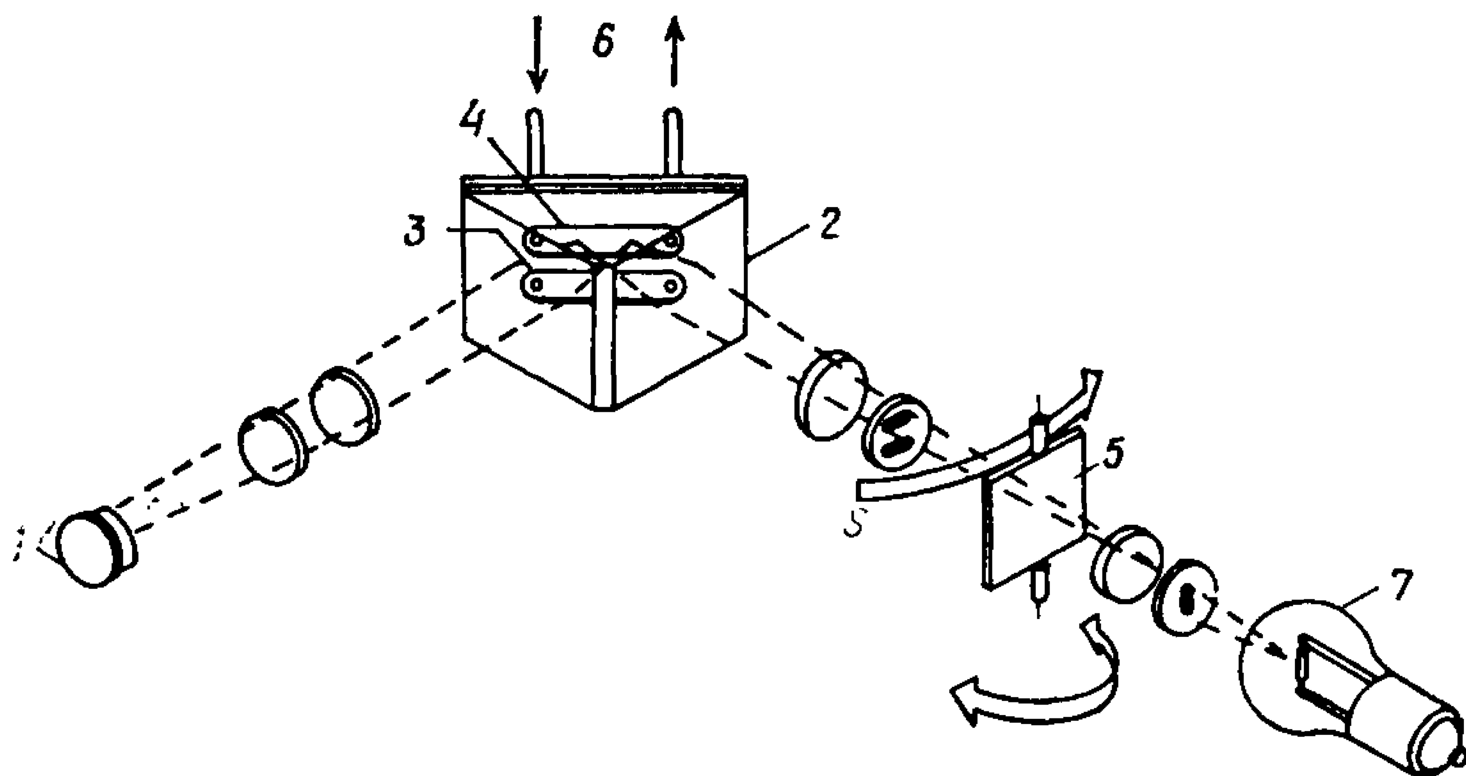


Рис. 8.20. Схема дифференциального рефрактометра, применяемого в жидкостном хроматографе фирмы Du Pont (модель 830) [31].

1 — фотодетектор; *2* — призма; *3* — ячейка сравнения; *4* — рабочая ячейка; *5* — отклоняющая пластина; *6* — образец; *7* — источник света.

Дифференциальный рефрактометр представляет собой в значительной степени универсальный детектор (исключая его использование при градиентном элюировании). Его применяют главным образом в тех случаях, когда образцы не поглощают в УФ-области или когда элюент сильно поглощает в этой области. Детектор этого типа измеряет разность показателей преломления элюента и раствора анализируемого вещества в элюенте. В рефрактометре френелевского типа луч света отражается от границы раздела стекло — жидкость и разность углов падения и отражения является функцией угла падения и показателя преломления. В другом типе рефрактометра измеряется интенсивность света, которая пропорциональна разности показателей преломления двух жидкостей. Каждая из жидкостей проходит через отдельную часть одной и той же ячейки, которая разделена стеклянной пластиной под диагонали. Такие приборы способны обнаруживать соединения при концентрации их до 5 мкг/мл. Достичь чувствительности $5 \cdot 10^{-5}$ единиц показателя преломления (RI ед.) можно, только если температура стандартного раствора и анализируемого раствора отличается не более чем на 0,005 °С. Рефрактометры френелевского типа исполь-

зуют в хроматографах фирм Du Pont, Varian, Nester-Faust. Оптическая схема рефрактометра Френеля показана на рис. 8.20 [31].

Анализируемая жидкость проходит через очень узкий зазор между стеклянной призмой и тефлоновой прокладкой, помещенной на металлической подложке. Часть света отражается от границы раздела стекло — жидкость, часть проходит через жидкость и отражается от металлической подложки. Интенсивность отраженного света пропорциональна показателю преломления жидкости. Аналогичный процесс происходит и в сравнительной ячейке. Когда растворенное вещество проходит через измерительную ячейку, самописец записывает сигнал, пропорциональный разности показателей преломления жидкостей. В хроматографе фирмы Du Pont, модель 830, используется ячейка объемом примерно 3 мкл. Отклик детектора линеен в области до 500-кратной разности концентраций. В прибор фирмы Waters Associates, модель ALC-201, введен отражательный тип рефрактометра, чувствительность которого достигает $6 \cdot 10^{-8}$ ед. рефракции.

В специальных случаях в жидкостной хроматографии применяют серию детекторов. Их детально описал Бирн [5]. Флуориметром можно регистрировать интенсивность флуоресценции, вызванной облучением анализируемого раствора. Возбуждающее излучение, длина волны которого обычно больше, чем у возбужденного излучения, исключают с помощью подходящего фильтра и измеряют фотоячейкой интенсивность флуоресценции. Если вещество само по себе не флуоресцирует, его обрабатывают реагентами, образующими с исследуемым соединением флуоресцирующие продукты. Чувствительность обнаружения сильно излучающих соединений может достигать 1 нг/мл. Диапазон использования ИК-спектрофотометров для исследования водных растворов в настоящее время значительно расширился. Этому, в частности, способствует применение ячеек фирмы Irtran. Измерения обычно проводят при постоянной длине волны, соответствующей частоте колебаний определенной функциональной группы. Кроме того, разработанные в настоящее время методики позволяют снять спектр исследуемого соединения практически мгновенно — всего примерно за 1 мс. Спектр регистрируется на осциллографе, и его можно затем сфотографировать. В некоторых случаях удается непосредственно идентифицировать соединение.

Пламенно-ионизационный детектор применяют в тех случаях, когда испарение элюента проходит при подходящей температуре и не сопровождается испарением или разложением исследуемого соединения. Часть элюата из колонки попадает на транспортер (лента, цепь или диск), который переносит элюат в испаритель.

Остаток после испарения элюата поступает в пиролизатор, газообразные продукты пиролиза подаются в ячейку пламенно-ионизационного детектора, содержащего измерительный электрод. Чувствительность такого метода составляет примерно 3 мг/мл.

Принцип действия термометрических детекторов — регистрация теплоты адсорбции и десорбции на поверхности. Эти температурные изменения регистрируются термисторами, и выходной сигнал записывается в виде дифференциальной кривой, соответствующей концентрационной кривой элюирования. Положение максимума пика соответствует пересечению волной нулевой линии. В жидкостном хроматографе фирмы Jeol чувствительность детектора может меняться в семи диапазонах от ± 1 до $\pm 0{,}001$% полной шкалы. Детекторы по радиоактивности предназначены для анализа соединений, содержащих ^{35}S, ^{14}C и ^{3}H. Ряд сцинтилляционных счетчиков существенно увеличивают чувствительность определения [15], особенно сцинтилляционные счетчики нового типа с пластмассовыми спиралями. Чтобы повысить чувствительность определения, используют также ячейки, заполненные твердым сцинтиллятором, через который проходит элюат, поступающий из колонки. Излучаемый сцинтиллятором свет регистрируется фотоумножителем.

Емкостные детекторы измеряют диэлектрическую проницаемость соединений. Выходные значения линейно зависят от разности между диэлектрической проницаемостью анализируемого соединения и элюента. Измерения проводятся при частоте 18 МГц. С помощью некоторых потенциометрических детекторов проводится измерение электродного потенциала. Относительно недавно доказана перспективность использования ион-селективных детекторов. Высокой чувствительностью обладает сульфидный электрод, который позволяет обнаруживать сульфид-ионы при концентрации их до 10^{-7} г-ион/л и в то же время не чувствителен к ряду других ионов. В настоящее время удалось уменьшить размеры полярографических детекторов и приспособить их для работы с проточными микроячейками.

В большинстве последних разработок используют плазменные источники для получения эмиссионных спектров элементов, входящих в состав элюента.

8.7. РЕГИСТРАЦИЯ И ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

В процессе хроматографического разделения непрерывно элюируемые из колонки компоненты проходят через детектор, или непосредственно, или после проведения предварительной реакции с подходящим реагентом. Аналоговый сигнал, выходящий из детектора, пропорционален концентрации соединения, находящегося в ячейке детектора, и этот сигнал регистрируется

самописцем. Концентрация каждого компонента, прошедшего через детектор, является функцией времени, на хроматограмме она записывается в виде пика. В идеальном случае пики имеют форму гауссовой кривой и количество соединения, прошедшего через детектор, пропорционально площади под кривой. Чтобы определить количество соединения, необходимо рассчитать площадь пика; сделать это можно вручную (разд. 10.5.2 л.) или же с помощью электронных, аналоговых или механических интеграторов (их применяют совместно с самописцами, и ошибка определения площади составляет при этом около 1%). Широко используется механический интегратор фирмы Disc Integrator Instruments. Этот интегратор регистрирует в графической форме площадь пиков в процессе его появления на том же самописце, или для регистрации можно приспособить отдельный самописец. Наиболее точное измерение площади обеспечивают электронные цифровые интеграторы (ошибка около 0,4%). На первом этапе автоматизации и использования компьютеров значения с ленты самописца считывались аналого-цифровым преобразователем, который их кодировал. Выходные данные с преобразователя вводились в компьютер, который проводил числовые расчеты. В преобразователе напряжение сигнала детектора преобразовалось в частоту. По мере прохождения пика импульсы суммировались и значение суммы за определенный промежуток времени выводилось на печать. Сумма импульсов пропорциональна площади пика. Этот метод расчета требует наиболее сложной логики, поскольку необходимо, чтобы выходные значения были скоррелированы с временем удерживания пика. Цифровой интегратор должен обладать большим линейным диапазоном, высокой частотой счета (например, 6000 имп/мин), большой цифровой емкостью (до 10^5) и чувствительностью.

При расчете количества присутствующего компонента по данным о величине соответствующего пика следует учитывать несколько факторов. Во-первых, важна эффективность детектора; выходной сигнал должен быть пропорционален поглощению и линеен (обычно до 1,5 ед. погл, для старых приборов). Если отсутствует линейное соотношение между площадью пика и количеством соединения, то необходимо построить калибровочную кривую. Относительные площади пиков не всегда пропорциональны количеству соединения, поскольку отклик детектора может различаться для разных типов молекул или разных классов соединения. С одним и тем же реагентом при идентичной молярной концентрации гомологи могут давать окраску различной интенсивности.

Не менее важным фактором является размывание пиков соединений с большим объемом удерживания. Для того чтобы получить информацию о количестве соединения, необходимо ум-

ножить площадь пика на коэффициент, определяемый в результате анализа стандартной калибровочной смеси. Таким способом удается исключить ошибки, вызванные изменением образца, аппаратурой и аналитической методикой.

Эффективные цифровые интеграторы используются для оценки результатов разделения, проведенного методом газовой или жидкостной хроматографии, главным образом в серийных анализах соединений одного типа, например аминокислот.

Следующая часть этого раздела посвящена оценке результатов. В процессе анализа аминокислот оценивается интенсивность окраски (обычно при 570 нм) продуктов реакции аминокислот с нингидрином. В начале элюирования самописец регистрирует только нулевую линию, которая может сдвигаться при изменении состава подвижной фазы. Если проводится количественный анализ, такие сдвиги следует учитывать. Интегратор обрабатывает сигнал детектора очень быстро (40—2000 имп/с), в результате чего регистрируется прохождение даже одиночного компонента. В интеграторе можно предусмотреть автоматическую коррекцию нулевой линии, и он начнет интегрирование, только когда нулевая линия существенно изменится за несколько секунд. Некоторые управляющие элементы, которые ранее являлись частью анализатора, теперь функционально включены в интегратор. Чтобы результаты расчета были правильными, важно принять во внимание форму пиков.

Некоторые логические функции интегратора демонстрирует рис. 8.21. Перед началом серии анализов необходимо стандартизовать анализ с помощью калибровочного образца, например 0,1 мкмоль каждой из аминокислот. Начало анализа (момент ввода пробы) является нулевой точкой на оси времени. Функции анализатора с этого момента программируются по отношению к временной оси. В начале разделения из колонки выходит компонент *А*, который не нужно принимать во внимание при проведении расчетов. Поэтому начало интегрирования сдвигается в точку *1*. Момент начала интегрирования можно ввести в программу вместе с другими данными. Во-первых, необходимо определить работу интегратора. С момента *2*, т. е. с момента появления компонента *Б*, интегратор суммирует значения импульсов до тех пор, пока не закончится элюирование *Б* (точка 3). Начало и конец элюирования *Б* определяются по приближению сигнала к уровню нулевой линии. Одновременно на хроматограмме указывается площадь полученного пика. Программная логика позволяет исключать очень маленькие пики (например, *В*) путем ввода в программу минимального допустимого значения. Если после прошествия определенного времени (*6*) нулевая линия не будет достигнута, то интегрируется только основная часть пика (от *4* до *5*). И интегратор автоматически корректирует положе-

ние нулевой линии путем переключения потенциометра прибора. Некоторые компоненты анализируемой смеси необходимо обнаруживать при других длинах волн, например, пролин обнаруживают при 440 нм. В момент (*7*), соответствующий началу пика пролина (*D*), детектор переключается на второй измерительный канал. После прохождения пика детектор переключается в прежнее положение (*8*), и измерения вновь проводятся при

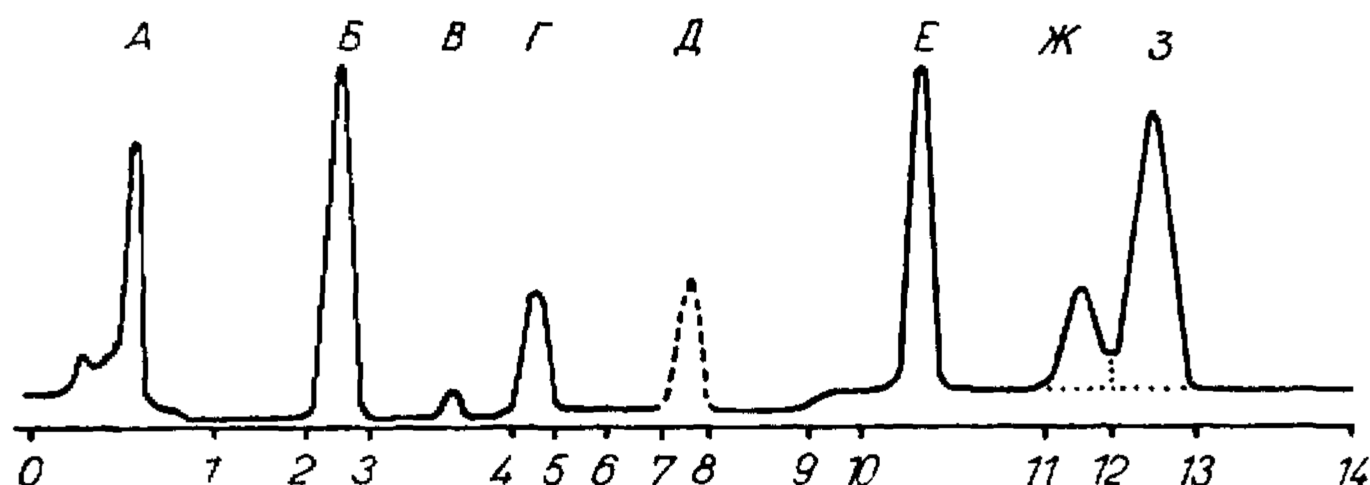


Рис. 8.21. Хроматограмма, полученная при автоматическом разделении ароматических аминокислот (поясняет работу интегратора).

0—14 — основные временные интервалы; *А* — неопределяемые аминокислоты; *Б—З* — определяемые аминокислоты; *Д* — пролин.

длине волны 570 нм. Через определенное время (*9*) после поступления буферного раствора другого состава происходит сдвиг нулевой линии; чтобы при этом не был зафиксирован ложный пик, вновь проводится автоматическая коррекция нулевой линии (*10*). При наличии двух не полностью разделенных пиков *Ж* и *З* интегратор рассчитывает площадь пика *Ж* в интервале *11—12*, а площадь пика *З* — в интервале *12—13*. Конец анализа программируется точкой *14*. По полученным величинам площадей отдельных пиков рассчитывается содержание каждой из аминокислот в анализируемой смеси. Эффективность интеграторов достаточна для обработки данных нескольких анализов.

В более современных приборах методика обработки данных существенно улучшена. Приведенные ниже данные получены главным образом на аналитической системе аминокислотного анализатора D-500 фирмы Durrum. Скорость анализа на этом приборе выше, чем на других типах анализаторов. Для количественного анализа достаточно 50 мкг белкового пиролизата. Объем проточной ячейки равен 1,9 мкл, а длина оптического пути составляет 5 мм. Источником света в детекторе служит лампа дневного света; луч света проходит через систему, которая с очень короткими интервалами направляет луч на фильтры

в 590 и 690 нм и создает два луча для фотометра. Фотометр дает линейную зависимость сигнала от поглощения. Организован параллельный выход на самописец и аналого-цифровой преобразователь с частотой преобразования в десять измерений в секунду с выводом цифровых значений на ЭВМ. В ЭВМ также вводится точный временной режим изменения состава буферных растворов, температуры и последовательности всех операций, включая ввод образцов и регенерацию колонки. Анализ проводится на одной колонке размером 1,75×48 см при примерно 190 атм и заканчивается за 48 мин.

Ввод в ЭВМ начальных параметров анализа и констант относительно прост и выполняется через печатное устройство в режиме ввода. В процессе анализа одновременно выдается графическая информация, проводятся количественные расчеты и выдаются результаты анализа. Результаты анализа могут записываться ЭВМ таким образом:

ПИК	НАЗВАНИЕ	МИН	СЕК	ТИП	ПЛОЩАДЬ	КОЛИЧЕСТВО
3	аспараг.	12	52	Ø	34156	11,7

ФАКТОР	НУЛЕВАЯ ЛИНИЯ
29212	99

ЭВМ сообщает номера пиков, названия аминокислот, время, прошедшее с момента начала анализа до момента выхода пика соответствующей кислоты в минутах и секундах, тип разрешения пика, площадь пика, количество соединения в наномолях, калибровочный коэффициент, используемый для расчетов, и уровень нулевой линии для того пика, для которого проводились расчеты. Можно также рассчитать молярное соотношение аминокислот в образце. С помощью этого прибора возможно количественное определение аминокислот при содержании их менее 1 нмоля; отношение сигнала к шуму выше, чем 30 : 1. ЭВМ также контролирует динамическую область анализатора. Полную область шкалы поглощения можно менять либо вручную, либо по команде ЭВМ в интервалах 0,1—0,2—0,5—1,0 и 2,0. Кроме того, при установленной шкале чувствительности область поглощения можно автоматически увеличить или уменьшить в соотношении 1 : 10 для определенного компонента. Изменение области поглощения проводится, в частности, в тех случаях, когда все компоненты (аминокислоты), исключая пролин и оксипролин, определяют в области поглощения 2,0, и только для этих двух компонентов ее необходимо расширить до 0,2 ед. погл.

В анализах с калиброванным образцом ЭВМ оценивает площадь пика и рассчитывает калибровочные постоянные для каждой аминокислоты; данные эти фиксируются ЭВМ и могут ис-

пользоваться для расчетов состава в последующих анализах образцов неизвестного состава. На таком приборе можно провести до 170 анализов в неделю.

8.8. РАСХОДОМЕРЫ И КОЛЛЕКТОРЫ ФРАКЦИЙ

В простейшей хроматографической системе элюат проходит через детектор, соединенный через расходомер с коллектором фракций. В процессе измерения расхода небольшие пузырьки воздуха вводятся в поток жидкости, скорость которого необходимо измерить. Скорость пропорциональна времени прохождения пузырька между двумя метками; наблюдения проводятся визуально или фотоэлектрически. Эти измерения можно проводить автоматически; ошибка определения при этом составляет примерно 1%. Расходомер фирмы LKB используется для длительного измерения расхода жидкостей в диапазоне от 0,5 до 300 мл/ч. Вводом пузырьков воздуха в капилляр управляют электронные импульсы. Эти пузырьки перемещаются потоком жидкости, и их прохождение регистрируется в определенном месте фотодиодом. Последующая точка на капилляре соответствует 250 мкл жидкости, второй фотодиод регистрирует только прохождение пузырьков установленного размера, а все остальные пузырьки не учитывает. Третий фотодиод, регистрирующий пузырьки, удален от второго на такое же расстояние (250 мкл). Сигнал в интегратор подается только в тот момент, когда одновременно в двух контрольных точках появляются новые пузырьки, так как при этом гарантируется правильность измерения времени. Если к системе подключен коллектор фракций, фракционируемый объем пропорционален минимальному объему в 250 мкл. Этот принцип измерения объема используется также в автоматических инжекторах с постоянным объемом дозирования: в них жидкость контактирует только со стеклом и тефлоном. В большинстве других приборов для измерения расхода жидкости чаще применяются сифоны постоянного объема. Когда сифон опустошается, жидкость перекрывает фоточувствительную ячейку и на хроматограмме отмечается начало новой фракции. Счетчики капель не пригодны для измерения расхода жидкости, если объем ее превышает 5 мл; кроме того, при их использовании возникают проблемы, связанные с изменением поверхностного натяжения или плотности жидкости.

В аналитической жидкостной хроматографии основное внимание уделяется снижению количества вещества, необходимого для анализа, и часто компоненты смеси перед подачей в детектор переводят в те или иные производные, поэтому фракции не собираются. В высокоэффективном варианте жидкостной хроматографии разделение проходит за относительно малое время.

Соединения проходят через детектор в виде узких зон, и обычно отбор фракций осуществляется при ручном управлении трехходовым краном в соответствии с видом хроматограммы, записываемой самописцем. В препаративной жидкостной хроматографии важна дальнейшая аналитическая оценка разделенных компонентов, поэтому элюат собирают в виде отдельных фракций. Ход разделения записывается самописцем в виде хроматограммы, на которой отмечается каждая фракция. Некоторые коллекторы фракций работают по сигналу детектора, как, например, в хроматографе ISCO, модель UA-2, фирмы BioCal. Фракции отбираются только в том случае, если величина поглощения превышает некоторое заданное значение.

В коллекторах фракций различают две основные части — управляющую и механическую. Работа управляющей части чаще всего основывается на принципе измерения постоянных интервалов времени, отмеряемых различными таймерами, как электронными, так и механическими. Работа некоторых других приборов основана на непосредственном измерении постоянного объема элюата при помощи сифонной системы или системы Volufrac. В некоторых системах измерение непосредственно объема заменено на отсчет капель или фотоэлектрическое измерение уровня жидкости в сосуде. На рабочей панели всех этих приборов в зависимости от принципа их действия указаны такие параметры, как время (от 0,1 до 999 мин), или число капель (от 1 до 999), или множитель объема сифона. Таким оборудованием снабжен коллектор фракций Linear II фирмы Serva.

Механическая часть обычно либо направляет элюат из детектора от одного стационарного сосуда в другой, особенно если отбираются фракции большого объема, либо выходная трубка неподвижна, а сосуды, обычно пробирки, сдвигаются. Часто коллектор фракций имеет форму диска с несколькими круговыми углублениями, в которые вставлены пробирки, и переход с одного круга на другой осуществляется специальным механизмом. В приборах других типов пробирки располагаются по спирали. Имеются аналогичные коллекторы фракций, в которых пробирки располагаются не по спирали, а по отдельным группам и перемещаются от одной группы к другой. В момент переноса потока от одной пробирки к другой поток элюата перекрывается кранами. Очень удобны такие коллекторы, в которых пробирки располагаются в штативах, объединенных в блоки. Они занимают очень мало места и позволяют легко манипулировать отдельными фракциями. Такие коллекторы обычно содержат от 80 до 400 пробирок. Некоторые коллекторы собирают фракции одновременно из нескольких колонок. Полный обзор коллекторов фракций можно найти в статье [12]. Большинство коллекторов снабжено предохранителями, которые препятствуют вы-

теканию жидкости из колонки в тех случаях, когда поток прерывается; они также могут остановить хроматографирование после заполнения последней пробирки. Коллекторы должны также работать при температурах ниже 0 °С.

8.9. БОЛЕЕ СЛОЖНЫЕ СИСТЕМЫ И ПРИМЕРЫ КОМПЛЕКСНОЙ АВТОМАТИЗАЦИИ

Рассмотрим возможность автоматизации хроматографического анализа ферментов на примере, заимствованном из статьи [42]. Авторы статьи провели хроматографическое разделение ферментов на автоматическом анализаторе фирмы Technicon (рис. 8.22). В этом приборе используется пропорциональный насос *P* с 12 пластмассовыми трубками различного диаметра. Буферный раствор из системы формирования градиента прокачивается в колонку через трубку *1*. Разделение белков происходит в колонке *K*. Основная часть элюата из колонки поступает в коллектор фракций *F* и затем используется после окончания анализа. В процессе хроматографирования от основного потока элюата отделяется очень небольшая часть, которая поступает в три аналитические секции, где проводится определение основной фосфатазы, трансаминазы и всех белков. После определения основной фосфатазы часть элюата поступает через трубку *2* вместе с пузырьками воздуха, введенными через трубку *3*, и субстратом из трубки *4* в аналитическую систему. В короткой стеклянной спирали *M* происходит тщательное смешивание водных растворов, полученная смесь проводится через термостат *I*, в котором при определенных условиях происходит расщепление субстрата. Чтобы реакция прервалась, к смеси через трубку *5* добавляется раствор соответствующего реагента. Через смесительную спираль результирующая смесь вводится в проточную кювету колориметра C_1 и затем идет на сброс. Сигнал детектора записывается самописцем *Z*, фиксирующим концентрацию основной фосфатазы (I). На абсциссу наносятся номера фракций. Определение трансаминазы проводится аналогичным образом. Через трубки *6—9* подаются образец, воздух, субстрат и реагент соответственно. Окончательный продукт реакции проходит через колориметр C_2. Результирующая концентрация трансаминазы пропорциональна кривой III записываемой самописцем. Третья аналитическая система, регистрирующая суммарное содержание белков, несколько проще, чем две другие. Часть элюата поступает через трубку *10*, воздух проводится через трубку *11*, а реагент для обнаружения белков — через трубку *12*. Растворы смешиваются в спирали *M*, полученная смесь поступает в проточную ячейку колориметра C_3. Содержание белков в смеси записывается в виде кривой II.

Шредер [33] решил проблему автоматического контроля в хроматографии пептидов следующим образом: после частичного гидролиза пептидов под действием гидроксида проводится известная реакция с нингидрином. Часть образца отбирается из

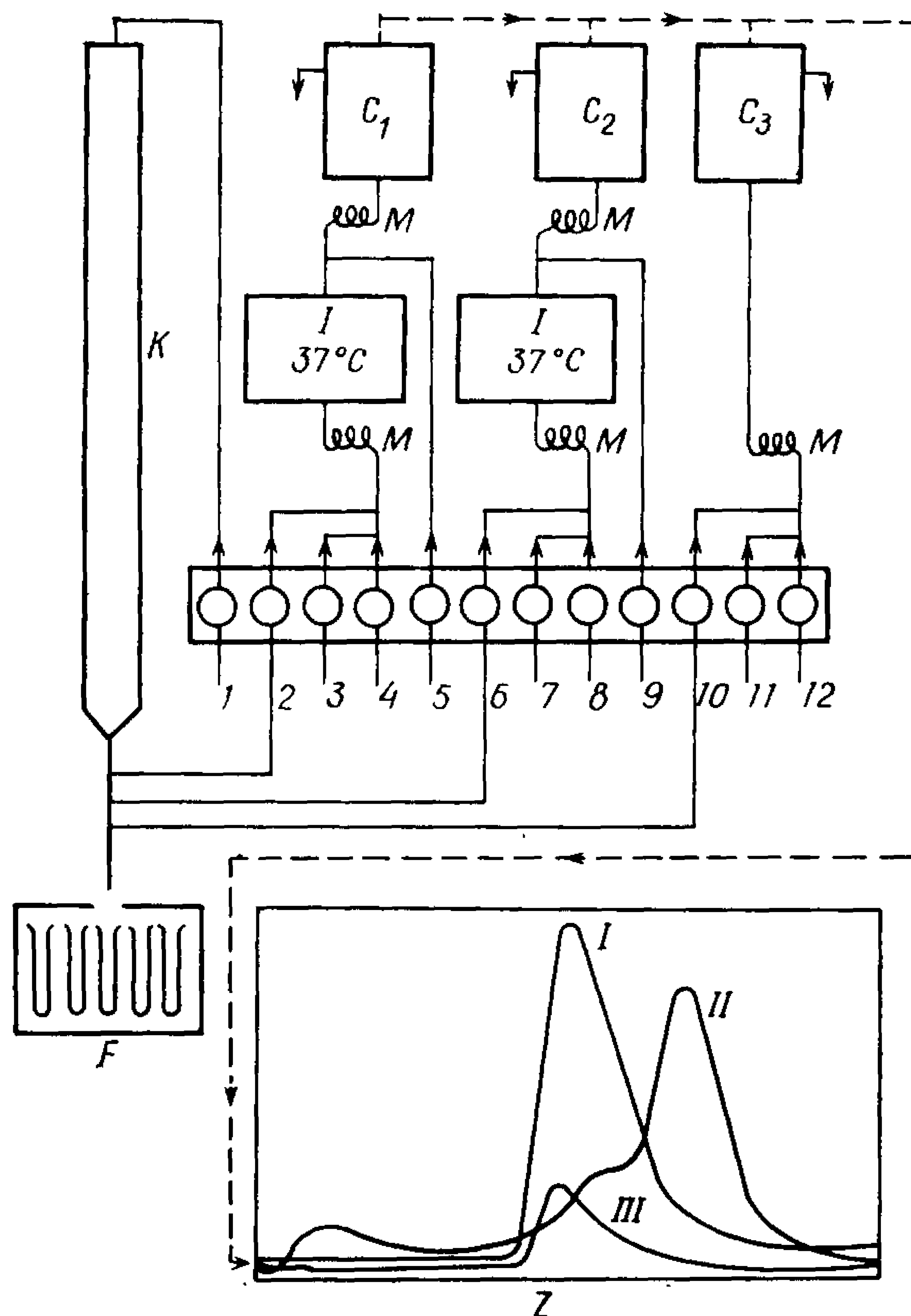


Рис. 8.22. Схема автоматического анализатора фирмы Technicon (установка для одновременного определения двух ферментов) [42].

C_1—C_3 — колориметры; *F* — коллектор фракций; *I* — термостат; *K* — колонка; *M* — стеклянные смесительные трубки; *P* — насос (*1—12* насосные трубки); *Z* — самописец. *I* — основная фосфатаза; *II* — белки, *III* — трансаминаза.

пробирок автоматически по окончании разделения и затем анализируется. Джонс [16] использовал модифицированную методику Катраваса [7], разработанную для проточной системы детектирования пептидов. Мачлейдт и др. [24] разработали методику автоматического разделения смесей пептидов на капиллярных колонках. В системе автоанализатора задаются программы для автоматического определения большого числа соединений.

Библиография, выпущенная фирмой Technicon [41], содержит 1825 ссылок.

С развитием автоматизации колоночной хроматографии увеличивается число применяемых реагентов и улучшается инструментальное оснащение [21]. Спакманом и др. [38] сконструированы оригинальные аминокислотные анализаторы, которые в настоящее время используются для автоматического анализа соединений типа сахаров и нуклеиновых кислот (нуклеотидов, нуклеозидов), пурина и пиримидиновых оснований. Так, например, на выпускаемом фирмой Jeol анализаторе аминокислот и нуклеиновых кислот, модель JLC-3BC, или выпускаемом фирмой Beckman «Multichrom» можно проводить анализ пептидов [1, 2, 17], сыворотки, анализы мочи, и эти приборы можно также использовать в таких относительно новых областях, как разделение фенолов, карбоновых кислот (на автоматических жидкостных хроматографах JLO-2A и JLO-6AH фирмы Jeol), спиртов и альдегидов, включая катехоламины [22].

В настоящее время приборы для высокоскоростной жидкостной хроматографии снабжаются автоматическими модулями, а иногда ЭВМ. Такие системы имеются в приборах фирмы Du Pont, модель 830 [32], и в жидкостном хроматографе, модель ALC 202/401 [45]. Эти приборы применяются для автоматического разделения пиретринов [32], антрахинонов [32] и хлорированных бифенилов [32], витаминов [44], пластификаторов полимеров [44], фенолов [45], фенилтиогидантоинов аминокислот [45, 48], олигосахаридов [47], катехоламинов [46], нуклеотидов [46], рибонуклеозидов [46], лекарственных средств [46], для технических анализов сиропов [47]. Эти области применения хроматографии подробно рассматривают Киркланд [19], Снайдер и Киркланд [37a], Крейчи, Пешан и Дейл [24a].

Некоторые примеры автоматического анализа методом колоночной твердо-жидкостной и жидко-жидкостной, ионообменной хроматографии и гель-хроматографии приведены в гл. 4—6.

СПИСОК ИНОСТРАННЫХ ФИРМ, ВЫПУСКАЮЩИХ ХРОМАТОГРАФЫ

Beckman Instruments, Inc., Spinco Division, Palo Alto, California, USA
BioCal, Richmond, California, USA
Disc Instruments, Inc., Santa Anna, California, USA
Du Pont De Nemours & Co., Instruments Products Division, Wilmington, Delaware, USA
Durrum Instrument Corporation, 1228 Titan Way, Sunnyvale, California, USA
Hamilton Company, P. O. Box 100 30, Reno, Nev. USA
Hewlett Packard, Avondale, Pennsylvania, USA
Hitachi Perkin-Elmer, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan
Jeol (Japan Electron Optics Laboratory Co.), Chiyoda-ku, Tokyo, Japan
Jobling Laboratory Division, Stone, Staffordshire ST 15 OBG, Great Britain

LKB — Produkter AB., Bromma, Sweden
MER Chromatographie, Mountain View, California, USA
Micrometrics Instrument, Norcross, Georgia, USA
Milton Roy Company, 5000 Park St. N, P. O. Box 12 169, St. Petersburg, Fla USA
Mikrotechna, Prague 4, Modrany, Czechoslovakia
Nester — Faust, Newark, Delaware, USA
Packard Instrument Co., Downers Grove, Illinois, USA
Packard — Becker, Delft, Holland
Pharmacia Fine Chemicals AB., Uppsala, Sweden
Phoenix Precision Instruments Co., Philadelphia, Pennsylvania, USA
Serva — Technik GMBI Co. Kg. 6009, Malsch near Heidelberg, BRD
Siemens AG., Karlsrune, BRD
Swagelok, Cleveland, Ohio, USA
Technicon Chromatography Corp., New York, USA
Varian Aerograph, Walnut Creek, California, USA
Development Workshops, Czechoslovak Academy of Sciences, 160 00 Prague 6, Czechoslovakia
Waters Associates Inc., Milford, Massachusetts, USA
Zavod Slovenskeho narodniho povstani, n. p., Ziar nad Hronom, Czechoslovakia

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bennet D. J., Creaser E. H.*, Anal. Biochem., **37**, 191 (1970).
2. *Benson J. B., Jones R. T., Cormick J., Patterson J. A.*, Anal. Biochem., **16**, 91 (1966).
3. *Bombaugh K. J., King R. N., Cohen A. J.*, J. Chromatogr., **43**, 332 (1969).
4. *Bombaugh K. J., Levangie R., King R. N., Abrahams L.*, J. Chromatog. Sci., **8**, 91 (1966).
5. *Бирн С. Г.*, в сб. «Современная практическая жидкостная хроматография». Пер. с англ./Под ред. Дж. Киркланда. — М.: Мир, с. 86.
6. *Byrne S. H., Schmit J. A., Jonson P. R.*, J. Chromatog. Sci., **9**, 592 (1971).
7. *Catravas G. N.*, Anal. Chem., **36**, 1146 (1964).
8. *Chandler C. D., McNair H. M.*, J. Chromatog. Sci., **11**, 468 (1973).
9. *Felton H.*, J. Chromatog. Sci., 7, 13 (1969).
10. *Генри Р. А.*, в сб. «Современная практическая жидкостная хроматография». Пер. с англ./Под ред. Дж. Киркланда. — М.: Мир, с. 95.
11. *Hitachi Ltd.*, Tokyo, Japan, Technical prospectus EX-E220.
12. *Holeyšovský V.*, in: Přiruckča laboratornich chromatografických metod, O. Mices (Ed.), p. 302; SNTL, Prague (1961); Laboratory Handbook of Chromatographic Methods, O. Mikes (Ed.), p. 332; Van Nostrand, London (1964).
13. *Horvath C. G., Lipsky S. R.*, Anal. Chem., **39**, 1893 (1967).
14. *Huber J. P. K.*, J. Chromatog. Sci., 7, 172 (1969).
15. *Hunt J. A.*, Anal Biochem., **23**, 289 (1968).
16. *Jones R. T.* in: Automation in Analytical Chemistry, Technicon Symposia, Vol. 1, p. 416, Medical Inc., White Planes, New York (1966).
17. *Jones R. T.* in: Methods of Biochemical Analysis, Vol. 18, D. Glik (Ed.), p. 205, Interscience-Wiley, New York (1970).
18. *Kesner L., Muntwyler E.*, Anal. Chem., **38**, 1164 (1966).
19. *Киркланд Дж. Дж.*, в сб. «Современная практическая жидкостная хроматография. Пер. с англ./Под ред. Дж. Дж. Киркланда. — М.: Мир, 1977.
20. *Kirkland J. J., De Stefano J. J.*, J. Chromatog. Sci., **8**, 309 (1970).
21. *Krejci K., Machleidt W.*, Z. Physiol. Chem., **350**, 981 (1969).
21a. Жидкостная колоночная хроматография. Пер. с англ./Под ред. З. Дейла, К. Мацека, Ж. Янака. — М.: Мир, 1977, с. 101.

22. *Lange H. W., Männl H. F. K., Hempel K.,* Anal. Biochem., **38**, 98 (1970).
22a. *Liteanu C., Gocan S.,* Gradient Liquid Chromatography, Horwood, Chichester (1974).
23. LKB-Produkter AB., Bromma, Sweden, Chem. Lab. 11300-70d-E.01-10M.
24. *Machleidt W., Kerner W., Joachim O.,* Z. Anal. Chem., **252**, 151 (1970).
24a. *McNair H. M., Chandler C. D.,* J. Chromatog. Sci., **12**, 425 (1974).
25. *Mikeš O.,* Chem. Listy., **54**, 676 (1960).
26. Жидкостная колоночная хроматография. Пер. с англ./Под ред. З. Дейла, К. Мацека, Ж. Янака. — М.: «Мир», 1977, с. 233.
27. *Peaker F. W., Tweedale C. R.,* Nature, **216**, 75 (1967).
28. *Peterson E. A., Sober H.,* Anal. Chem., **31**, 857 (1959).
29. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden, Separation, News, January (1974).
30. Phoenix Precision Instrument, Downers Grove, Illinois, USA, Bulletin K-8000-C.
31. Du Pont De Nemours & Co., Instrument Products Division, Wilmington, Delaware, USA, Technical prospectus 830 PB2 (1971).
32. Du Pont De Nemours & Co., Instrument Products Division, Wilmington, Delaware, USA, Technical prospectus 830 PB3 (1971).
33. *Schroeder W. A., Robberson B.,* Anal. Chem., **37**, 1583 (1965).
34. *Scott C. D.,* J. Chromatog., **42**, 263 (1969).
35. *Scott C. D., Johnson W. F., Walker V. E.,* Anal. Biochem., **32**, 182 (1969).
36. *Scott C. D., Lee N. E.,* J. Chromatog., **42**, 263 (1969).
37. *Snyder L. R.,* Anal. Chem., **39**, 705 (1967).
37a. *Шнайдер Р. Л., Киркланд Дж. Дж.,* Введение в современную жидкостную хроматографию. — М.: «Мир», 1977.
38. *Spackman D. A., Stein W. H., Moore S.,* Anal. Chem., **30**, 1190 (1958).
39. *De Stefano J. J., Bechell H. C.,* J. Chromatog. Sci., **8**, 434 (1970).
40. Technicon Chromatography Corp., Ardsley, New York, USA, Technical prospectus 722-4-5-10M (1964).
41. Technicon Chromatography Corp., Ardsley, New York, USA, Technicon Autoanalyzer Bibliography 1957/1967 (1968).
42. Technicon Chromatography Corp., Ardsley, New York, USA, Technical prospectus R12-6-5C (1968).
43. *Young T. E., Maggs R. J.,* Anal. Chim. Acta, **38**, 105 (1967).
44. Waters Associates Inc., Milford, Massachusetts, USA, Technical Prospectus PB 209 (1972).
45. Waters Associates Inc., Milford, Massachusetts, USA, Technical prospectus PB73-210 (1973).
46. Waters Associates Inc., Milford, Massachusetts, USA, Technical prospectus DS 048F (1974).
47. Waters Associates Inc., Milford, Massachusetts, USA, Technical prospectus DS 049F (1974).
48. Waters Associates Inc., Milford, Massachusetts, USA, Technical prospectus AH 337 (1974).
49. *Zerfing R. C., Veening H.,* Anal. Chem., **38**, 312 (1966).

Глава 9. Тонкослойная хроматография

О. МОТЛ, Л. НОВОТНЫЙ

Институт органической химии и биохимии
Чехословацкой Академии наук, Прага

9.1. ВВЕДЕНИЕ

Среди современных хроматографических методов, в значительной мере способствовавших развитию анализа органических и биоорганических соединений и совершенствованию способов препаративного разделения, заметное место занимает тонкослойная хроматография. В процессе разделения указанным методом анализируемая смесь перемещается вместе с подвижной фазой по тонкому слою порошкообразного сорбента, обычно нанесенного на стеклянную пластинку. В зависимости от природы сорбента при этом допускается использование одного или сразу нескольких принципов хроматографического разделения. Тонкослойная хроматография начала быстро развиваться примерно с 1958 г. главным образом благодаря работам Шталя [46], усовершенствовавшего методику ТСХ и предложившего практически современный ее вариант. До 1958 г. в печати, безусловно, появлялись отдельные статьи, посвященные данной теме; так, первые статьи были опубликованы еще в конце прошлого века, но они почти не были замечены. Истории развития хроматографии посвящен специальный раздел монографии Кирхнера [26]. Главная причина относительно быстрого распространения ТСХ заключается в следующем: этот метод позволяет достаточно быстро осуществить довольно эффективное разделение (400—3000 теоретических тарелок в зависимости от характера и метода разделения [16]), используя простые и недорогие приспособления. Другое преимущество ТСХ — широкая область применения — от качественного и полуколичественного анализа до препаративного разделения. Так, методом ТСХ можно обнаруживать следы соединений и выделять за одну операцию порядка одного грамма соединения, пользуясь легкодоступными сорбентами, растворителями и обнаруживающими реагентами. Кроме

того, с помощью ТСХ можно контролировать результаты разделения, проведенного другими способами, например перегонкой, колоночной хроматографией, рекристаллизацией и т. п. Можно также использовать ТСХ для предварительной оценки структуры хроматографируемого соединения. Область применения ТСХ, которая с самого начала ее развития была достаточно широкой [38, 76], еще более расширилась благодаря универсальности метода (непрерывное и двумерное элюирование, электрофорез и гель-фильтрация в тонком слое). Благодаря своим преимуществам метод ТСХ часто вытесняет, а во многих случаях уже вытеснил бумажную хроматографию, в которой также используется плоскостное расположение хроматографической системы. Однако в последнее время количество опубликованных статей, посвященных ТСХ, несколько уменьшилось, несмотря на то что разработаны новые модификации метода, увеличивающие его разрешающую способность и чувствительность [22а, 54а].

9.2. АППАРАТУРА ДЛЯ ТСХ

9.2.1. ПЛАСТИНКИ, ПРИСПОСОБЛЕНИЯ ДЛЯ НАНЕСЕНИЯ СОРБЕНТОВ, СПОСОБЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ТОНКИХ СЛОЕВ

Хроматографические тонкие слои можно приготовить непосредственно в лаборатории или же можно воспользоваться готовыми к употреблению тонкими слоями, выпускаемыми рядом фирм (см. ниже табл. 9.3).

В лаборатории тонкие слои обычно наносят на стеклянные пластинки размером 20×20 или 10×20 см, а иногда 5×20 см и толщиной 1,3—4 мм. Во многих лабораториях успешно используют микропластинки размером 25×75 мм, изготовленные из предметных стекол микроскопа. Иногда применяют несколько большие пластинки, например 75×100 мм, полученные посредством очистки старых фотографических пластинок. На пластинках последних двух типов проводят быстрый предварительный хроматографический анализ или анализ не слишком сложных смесей, которые содержат компоненты, значительно различающиеся по своей полярности. Для препаративного разделения обычно пользуются пластинками размером от 20×20 до 20×100 см. Поверхность пластинок обязательно должна быть чистой. Этого можно добиться, удалив ранее нанесенный слой и обнаруживающие реагенты и проведя тщательное обезжиривание; при этом всегда необходимо следить, чтобы не были повреждены края пластинок.

В некоторых случаях применяют специальные стеклянные пластинки (практически готовые для нанесения образца) со

слоем адсорбента, полученным путем спекания* силикагеля и стеклянного порошка [44]. Эти пластинки прочны, и на них, как и на простых стеклянных пластинках, можно проводить обнаружение реагентами, вызывающими коррозию. Такие пластинки можно регенерировать. С этой целью их погружают в смесь хромовой и серной кислот, после чего тщательно промывают водой и активируют прокаливанием. При таком регенерировании на одних и тех же пластинках можно проводить до 15—25 разделений. Можно также пропитывать пластинки различными растворами, в частности растворами ацетата натрия, борной кислоты, парафиновым и силиконовым маслами. Ито и др. [22] утверждают, что применение таких пластинок более экономично, чем использование обычных пластинок с нанесенными поливом слоями сорбента. Однако пластинки со спеченным слоем непригодны для препаративного разделения.

В ТСХ применяются также хроматографические пластинки особого типа. Основу таких пластинок составляет стеклянная ткань, на которую с обеих сторон нанесен слой силикагеля. Согласно данным фирмы Gelman Instrument Co., выпускающей такие пластинки, так называемая мгновенная тонкослойная хроматография на пластинках из стеклянной ткани обеспечивает более быстрое и четкое разделение, кроме того, указанные пластинки удобнее в работе и на них можно быстрее нанести образец. Пластинки из других неорганических материалов, например алюминия, применяются реже, обычно в тех случаях, когда обнаружение проводится серной кислотой и для эффективного обугливания хроматографируемых веществ требуются относительно высокие температуры, как, например, при разделении восков, парафинов, тритерпенов и т. п. При промышленном изготовлении готовых к употреблению тонких слоев, например слоев силуфола (фирма Kavalier Glass-Works) или ТСХ алюминий шитс (фирма Merck), часто используется листовой алюминий или алюминиевая фольга. Преимущество этих и им подобных материалов состоит в том, что из них можно вырезать ножницами полоски требуемых размеров и формы и полученные на них хроматограммы удобно хранить. Толщина такой фольги составляет примерно 0,1 мм, и ее поверхность иногда пассивируют.

В дополнение к неорганическим термостойким материалам некоторые фирмы используют подложки из пленок органических полимеров (например, полиэтилентерефталата) толщиной 0,25 мм, которые можно нагревать до 120 °С. Эти прозрачные

* Фирма Applied Science поставляет такие пластинки (пластинки пермакотс) двух размеров: 5×20 и 2,5×7,5 см. Адреса фирм приведены в конце главы.

пленки обладают теми же преимуществами, что и листовой алюминий.

Наносят сорбент на пластинки с помощью различных приспособлений, в большинстве случаев стандартных. В принципе используются два типа приспособлений: резервуар или разравни-



Рис. 9.1. Основное оборудование для тонкослойной хроматографии: лоток-шаблон и приспособление для нанесения сорбента, стеклянные пластинки, держатель для пластинок, применяемых при их активации, стойка для готовых пластинок (с разрешения фирмы Desaga).

ватель суспензии сорбента перемещается над рядом пластинок, положенных вплотную друг к другу*, или под неподвижным резервуаром с суспензией сорбента перемещаются пластинки**. В литературе описано также несколько самодельных приспособлений [6, 70], но в настоящее время они редко применяются. Рассмотрим, как работает предложенное Шталем классическое приспособление для нанесения сорбента (фирма Desaga). В это приспособление (рис. 9.1) входят большой лоток-шаблон, изготовленный из прочного листового материала, в который помещают подложки-пластинки, на которые предполагается нанести слой, и собственно приспособление для нанесения сорбента (рис. 9.2). Лоток-шаблон обычно изготавливают из пластмассы, но можно использовать и зеркальное стекло. На двух смежных сторонах лотка эпоксидным клеем приклеивают полоски стекла. Площадь лотка, ограниченного с двух сторон барьерами, равна 110×20,3 см. Важно, чтобы свободный длинный край лотка был абсолютно прямым и ровным, потому что именно вдоль этого края перемещается наносящее устройство. Толщина подложек не должна превышать 3/4 высоты барьера. С помощью такого устройства можно наносить слои адсорбента на микропластинки, но в этом случае следует расположить подложки на лотке так, чтобы они покрывали всю его поверхность. Кроме того, поверхность лотка необходимо слегка смочить, чтобы микропластинки лучше к нему прилипали. Толщина подложек должна быть одинаковой, а края их — неповрежденными. При работе с наносящим устройством Shandon, конструкция лотка в котором сложнее и подложки выравниваются снизу с помощью роликов, эти требования не выдвигаются.

На рис. 9.3 показана схема приспособления для нанесения сорбента, разработанного Шталем. Это приспособление пригодно для нанесения большинства сорбентов на различные подложки. Приспособление фирмы CAMAG (рис. 9.4) поставляется в двух вариантах для пластинок шириной 10 и 20 см. Разработаны и другие типы приборов, см., например, [21, 28]. Приготавливать тонкослойные пластинки необходимо чрезвычайно тщательно, так как только на пластинках требуемого качества можно получить хорошее и воспроизводимое разделение. Адсорбент, подобранный при предварительных опытах на микропластинках, обычно наносят в виде слоя толщиной 0,25 см. Наиболее целесооб-

* Например, приспособления для нанесения сорбента на пластинки, изготовляемые фирмами Desaga, Shandon, Research Specialities, Applied Science и др.

** Наиболее простое устройство этого типа выпускает фирма CAMAG; другие устройства, выпускаемые большими сериями и предназначенные для применения в специализированных лабораториях или на производстве, имеют более сложную конструкцию.

разно приготовлять сразу большую партию пластинок, применяя какое-либо из указанных устройств.

Когда стеклянные подложки помещают в лоток, в него сначала кладут вспомогательную подложку размером 5×20, после чего вплотную укладывают подложки нужного размера (например, десять подложек размером 10×20 см или пять подложек размером 20×20 см) и заканчивают ряд еще одной пластинкой размером 5×20 см. По желанию можно всегда отмечать порядок расположения подложек, лучше всего в порядке возрастания или убывания их толщины. Далее в соответствии с инструкцией изготовителя, приготавливают суспензию сорбента; обычно сорбент смешивают с удвоенной навеской воды. Методика приготовления подробнее изложена в тех разделах главы, где описываются различные сорбенты. Наносящее приспособление помещают на вспомогательную пластинку, заполняют суспензией и поворачивают его ручку на 180°. Необходимо следить за тем, чтобы свободное отверстие было открыто. Когда суспензия начинает вытекать, наносящее устройство равномерно передвигают вдоль ряда пластинок с такой скоростью, чтобы весь процесс длился не более 30—40 с. Если сорбент наносится со связующим веществом, то необходимо закончить нанесение до того, как суспензия начнет расслаиваться. Далее устройство

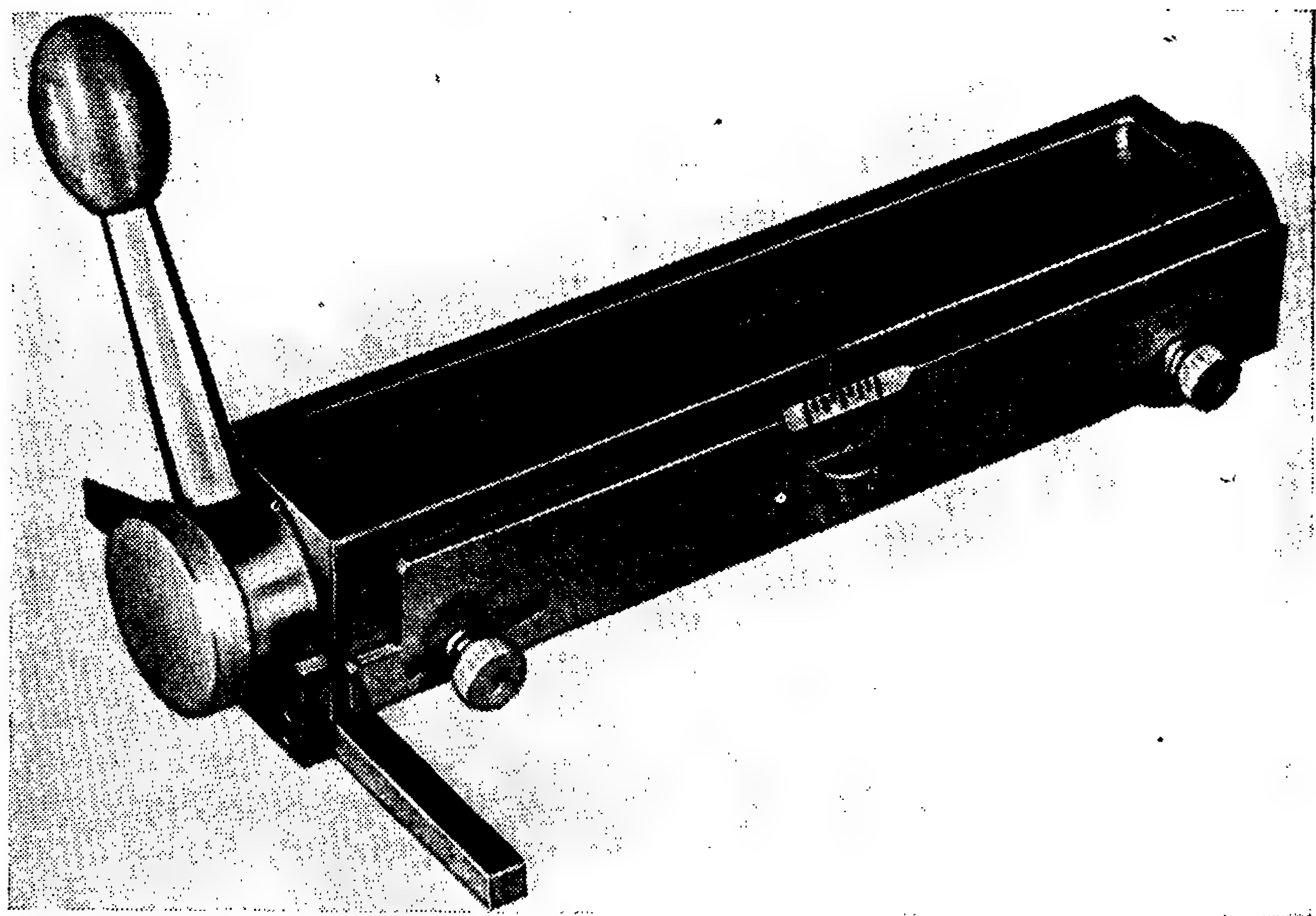
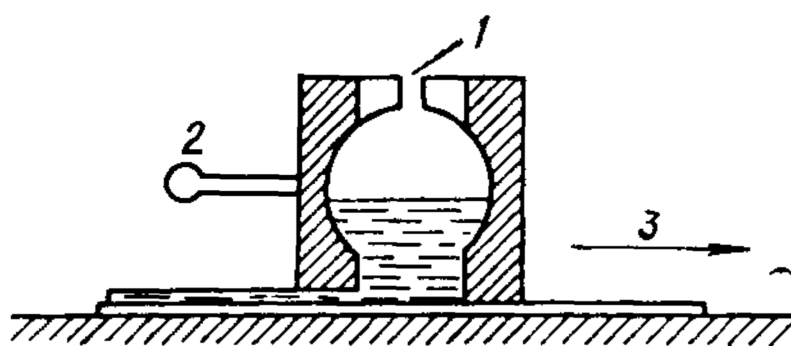


Рис. 9.2. Универсальное приспособление для нанесения слоя сорбента заданной толщины (с разрешения фирмы Desaga).

разбирают и сразу же чистят. Если слой нанесен неровно, то иногда его можно выправить, постукивая по пластинке снизу, но это требует сноровки и опыта. Нанесенные слои полностью высушивают при комнатной температуре. Если пластинки необходимо активировать, то сначала их сушат на воздухе примерно 20 мин, после чего переносят в штатив и в течение 30 мин активируют в сушильном шкафу при 100—110 °С. При активации пластинки должны находиться в вертикальном положении. Слои оксида алюминия активируют, как правило, при 135 °С в тече-



. 9.3. Схема приспособления системы Шталя для нанесения сорбента (поперечный разрез).

1 — отверстие для сообщения с атмосферой; *2* — ручка для поворачивания; *3* — направление движения.

ние 4 ч. Готовые пластинки хранят обычно в горизонтальном положении в пластмассовых коробках, а в особых случаях в эксикаторах. Активность слоев силикагеля можно определить, применяя три азокрасителя [62].

Однако использование специальных устройств для нанесения адсорбента совсем не обязательно, можно наносить суспензию на подложки широким шпателем или погружать подложки в суспензию адсорбента. Последний метод наиболее удобен для получения микропластинок. Две пластинки складывают вместе и просто погружают в суспензию силикагеля в хлороформе, ацетоне или смеси хлороформа с этанолом.

Так называемые незакрепленные слои применяются очень редко, поскольку они недостаточно прочны; способ их приготовления описан выше в разделе, посвященном определению активности оксида алюминия (гл. 4, разд. 4.2.3). Подобное же устройство для нанесения сорбента пригодно для получения слоев сефадекса [2].

В крайнем случае можно приготовить достаточно большое число микропластинок с закрепленными слоями с помощью простого скребка. Предметные стекла для микроскопа закрепляют по краям клеящей лентой на специальной пластинке, так чтобы скребок (или валик) находился чуть-чуть выше пластинки, и проводят толстым краем скребка над пластинками.

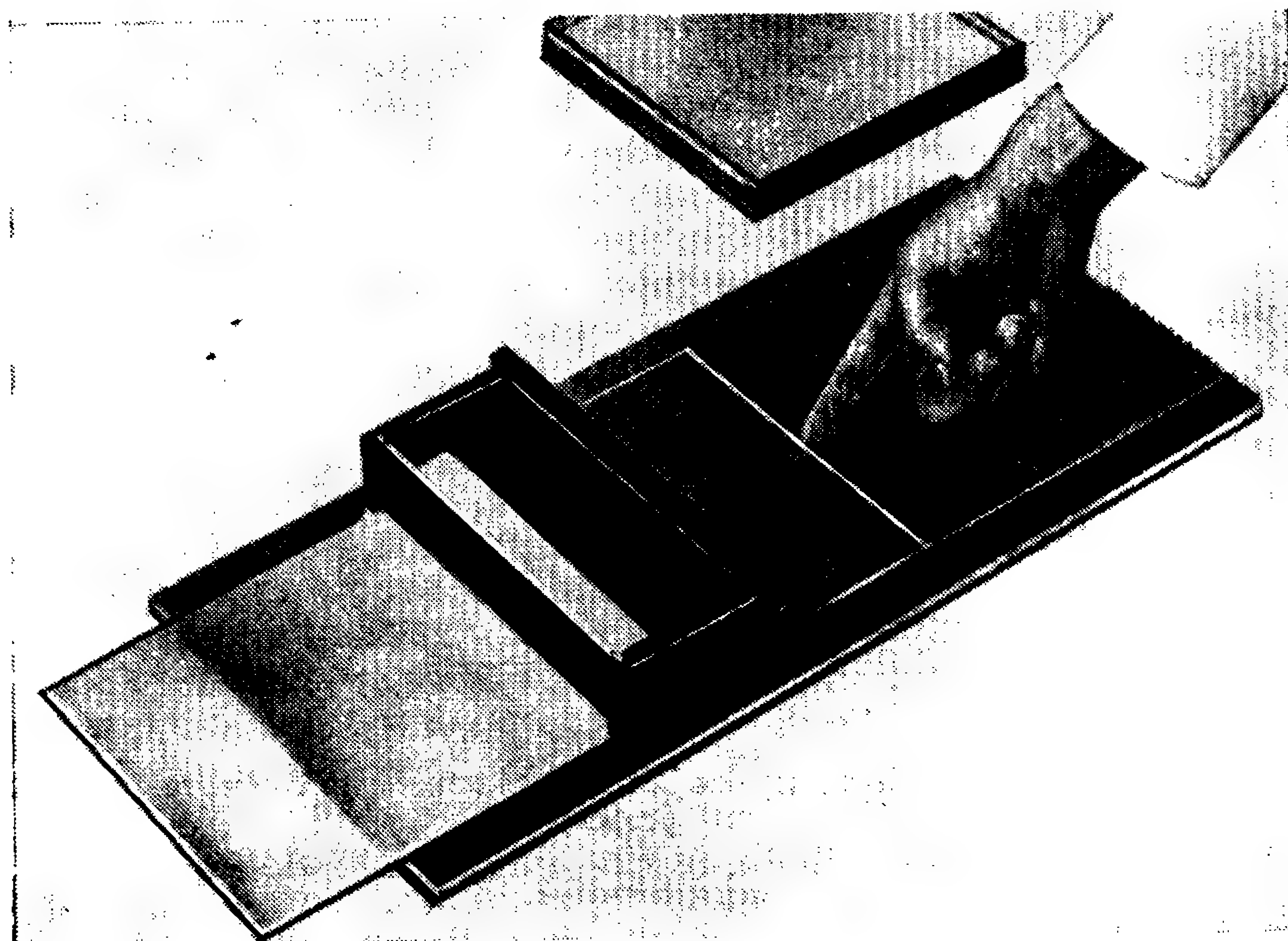
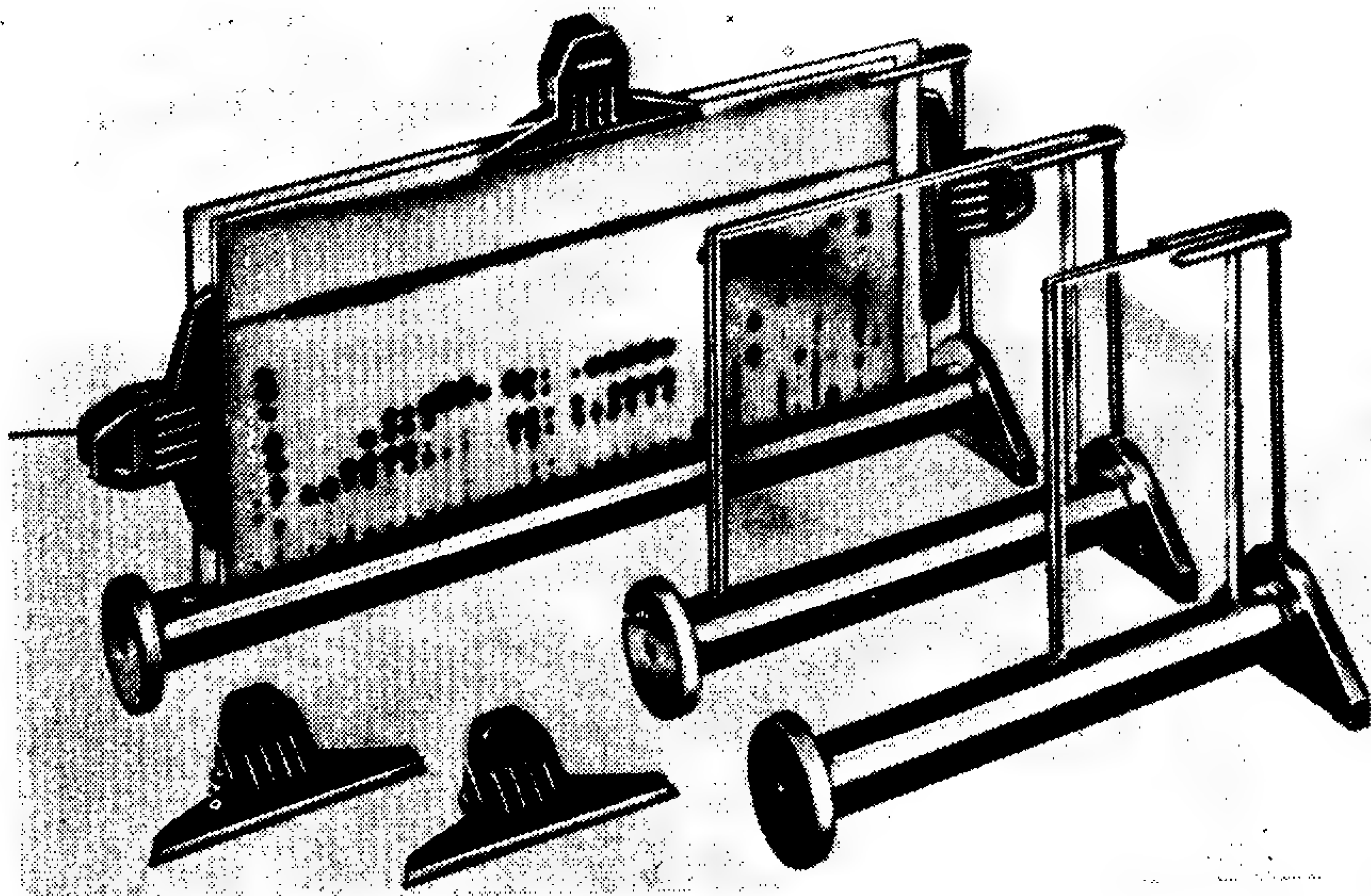


Рис. 9.4. Приспособление для нанесения сорбента фирмы CAMAG с неподвижным резервуаром для суспензии (с разрешения фирмы CAMAG).

9.2.2. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ КАМЕРЫ И КАМЕРЫ ДЛЯ ОПРЫСКИВАНИЯ

Поскольку в ТСХ обычно элюируют восходящим методом, прежде всего мы кратко опишем камеры, применяемые именно в этом случае. Чаще всего это простые прямоугольные стеклянные лотки, соответствующие пластинкам по размерам. Такие камеры обычно называют N-камерами*. Для пластинок размером 20×20 см применяются N-камеры размером 21×21×6 см. Для элюирования микропластинок удобны стеклянные сосуды, используемые для окрашивания биологических препаратов, нанесенных на предметные стекла. В этих камерах можно элюировать сразу две пластинки, если расположить их в форме буквы V, обратив слои друг к другу. Элюировать одновременно больше двух пластинок можно, отделив их друг от друга изо-

* Сокращенные обозначения типов камер: N — Normalkammer (нормальная камера), расстояние от слоя до стенки камеры ≫3 мм; S — Schmalkammer (узкая камера), расстояние от слоя до стенки камеры <3 мм; KS — Konditioner S-Kammer (узкая камера с переменными условиями хроматографирования).



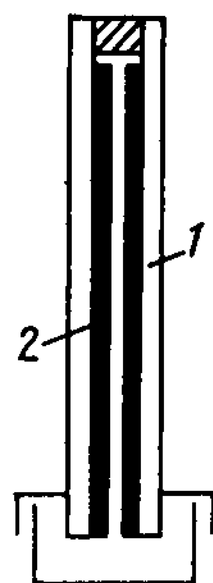


Рис. 9.5. S-Камера (с разрешения фирмы Desaga).

а — камера фирмы Desaga; *б* — схема заполнения этой камеры (*1* — крышка; *2* — тонкослойная пластинка с образцом).

гнутыми стеклянными палочками или поместив в специальную камеру. Так, например, в камере, выпускаемой фирмой Shandon, можно элюировать одновременно 12 пластинок. Верхние края камер притерты и закрываются стеклянными крышками, края которых также притерты, чтобы можно было герметизировать камеру. В специальных целях применяются крышки со вводным и выводным отверстиями, чтобы можно было заполнить камеру инертным газом. Пластинки размером 5×20 см можно элюировать в цилиндрических камерах, например изготовляемых фирмой Applied Science Lab. Чтобы атмосфера камеры была насыщена парами растворителя, что необходимо для «предваритель-

ного насыщения» сорбента, стенки камеры обкладывают фильтровальной бумагой.

S-Камеры, выпускаемые фирмами Desaga, CAMAG и др. (рис. 9.5), представляют собой специальный тип камер с очень маленьким свободным объемом, заполняемым газовой фазой (парами растворителя), так что затраты элюента при элюиро-

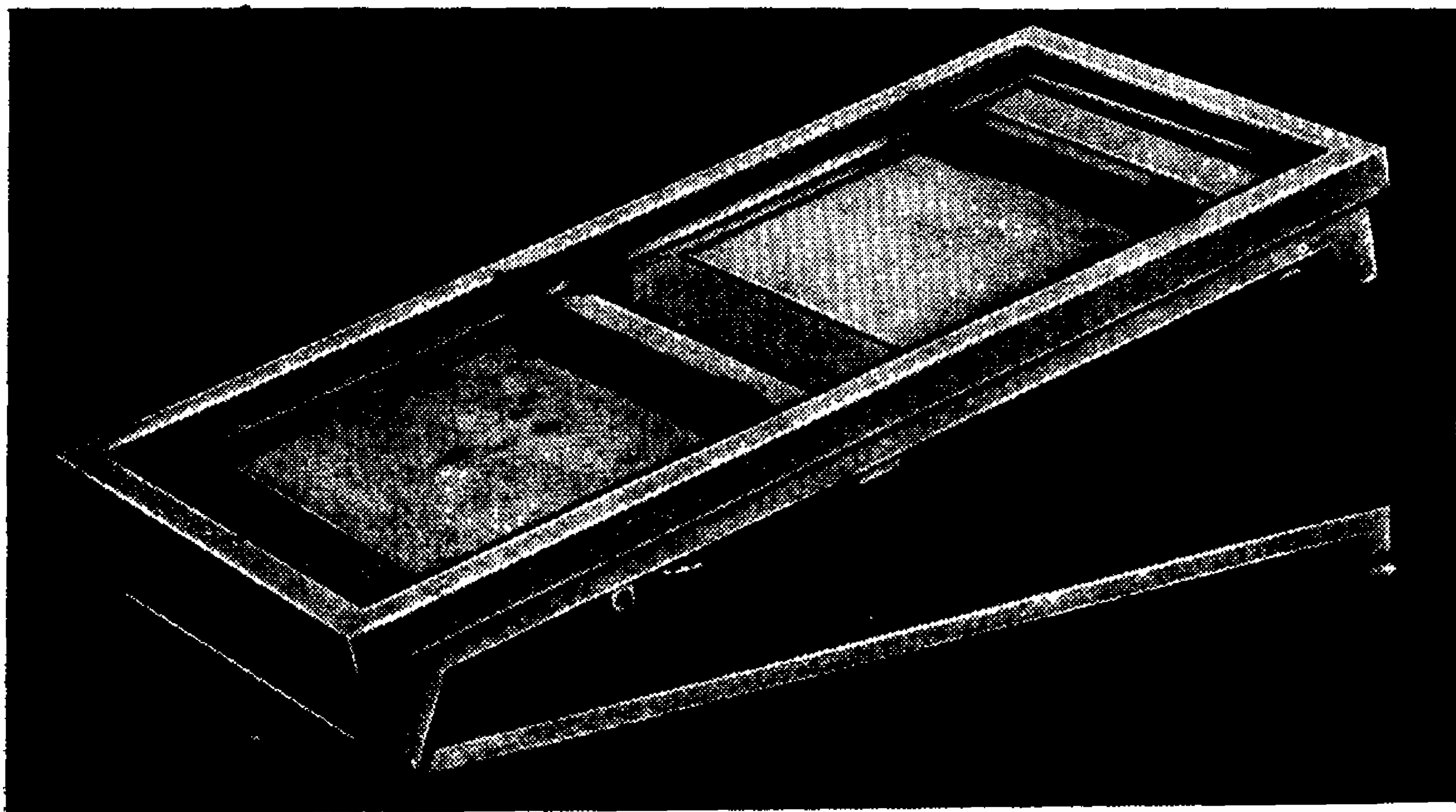


Рис. 9.6. Камера для нисходящего элюирования методом тонкослойной гель-хроматографии (с разрешения фирмы Pharmacia).

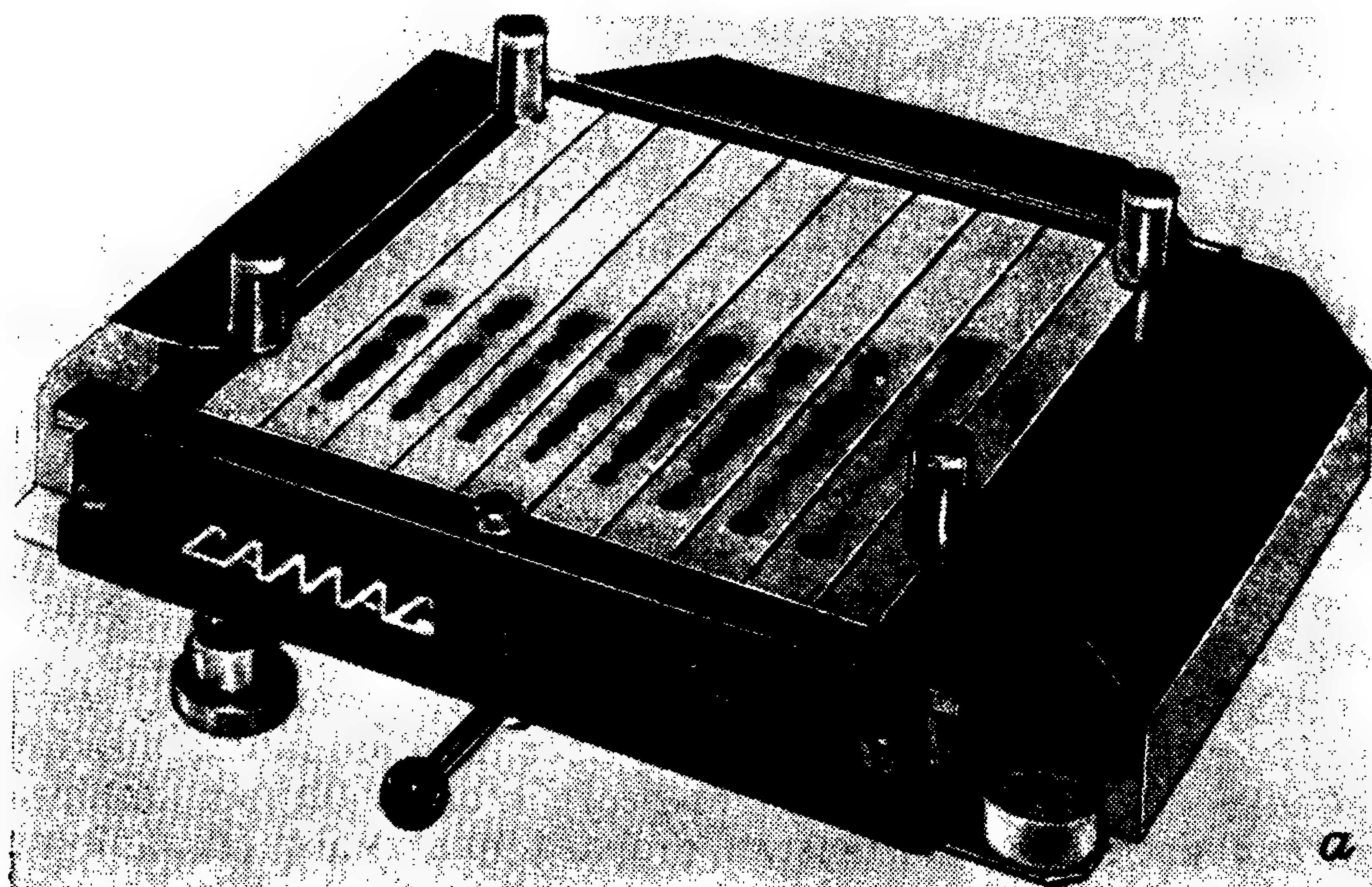
Находящаяся в камере пластинка со слоем геля с обоих концов соединена с резервуарами с растворителем посредством мостиков из фильтровальной бумаги ватман 3ММ. Эти мостики необходимо предварительно тщательно пропитать элюентом.

вании очень невелики (рис. 9.5, *а*). Такая камера обычно состоит из двух стеклянных пластинок (чаще всего размером 20× ×20 см): собственно хроматографической пластинки и прикрывающей ее пластинки, края которой с трех сторон приподняты. Такое устройство обеспечивает практически ненасыщенную атмосферу во время хроматографирования. Если необходимо насыщение, то на покрывающую пластинку наносят сорбент, смоченный соответствующими растворителями (рис. 9.5, *б*).

Элюирование на незакрепленных слоях ведут в неглубоких лотках, где слой опирается на более короткую сторону лотка и, таким образом, располагается обычно под углом около 20° к горизонтали. Прежде чем помещать такую пластинку в лоток, его с одного края слегка приподнимают (например, с помощью подпорки) и наливают растворитель на глубину 5—10 мм. После этого помещают пластинку таким образом, чтобы ее нижний конец опирался на сухой край дна лотка. Затем покрывают

камеру крышкой и наклоняют в противоположном направлении так, чтобы край пластинки погрузился в растворитель.

На рис. 9.6 показана выпускаемая фирмой Pharmacia камера для нисходящего хроматографирования [2], предназначенная для тонкослойной гель-хроматографии. Для горизонтального элюирования при различных, но точно устанавливаемых условиях предварительного насыщения слоя сорбента можно использовать KS-камеры (рис. 9.7). Оптимальные условия разделения в этих камерах можно быстро установить. Другие типы камер, используемые для специальных методов, например проточного (непрерывного) элюирования, градиентного элюирования или круговой хроматографии, описаны в монографиях по ТСХ [29,



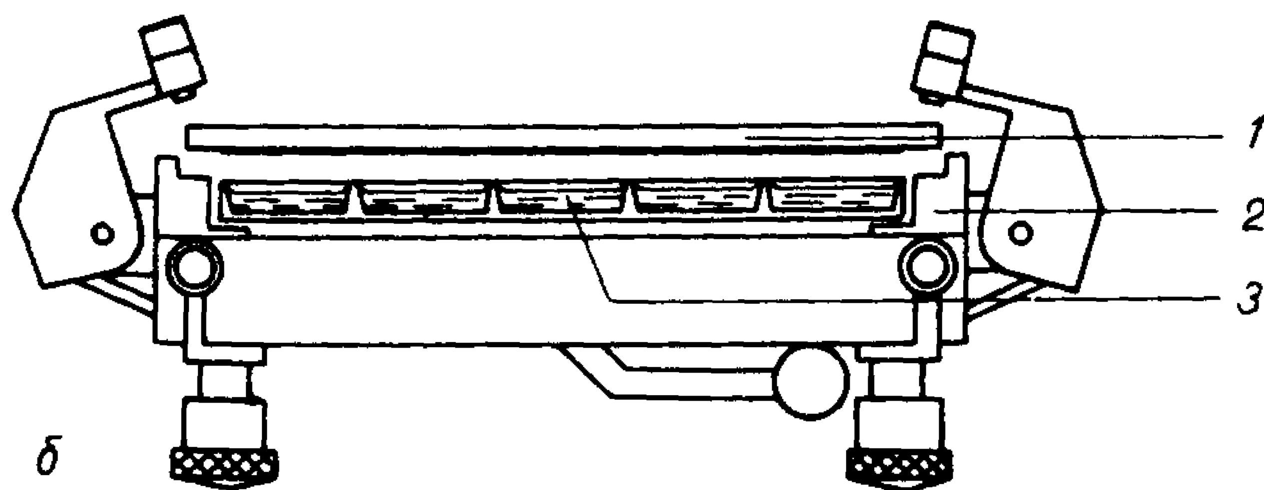


Рис. 9.7. Камера типа Vario-KS (система Гейсса и Шлитта, производство CAMAG, с разрешения фирмы CAMAG).

а — общий вид; *б* — схематический разрез: *1* — подложка со слоем сорбента, отстоящим от краев на 20 мм (слой обращен вниз); *2* — край камеры; *3* — резервуары для растворителя, используемые с целью предварительного насыщения слоя.

37]. Вопросы, связанные с применением различных типов камер, растворяющих систем и тонких слоев с регулированием состава газовой фазы рассматривает Гейсс [16].

По окончании элюирования пластинки обычно сушат на воздухе при комнатной температуре, в вытяжном шкафу при ИК-облучении или в сушильном шкафу. Обнаружение (методы обнаружения, реагенты и аппаратура для опрыскивания описа-

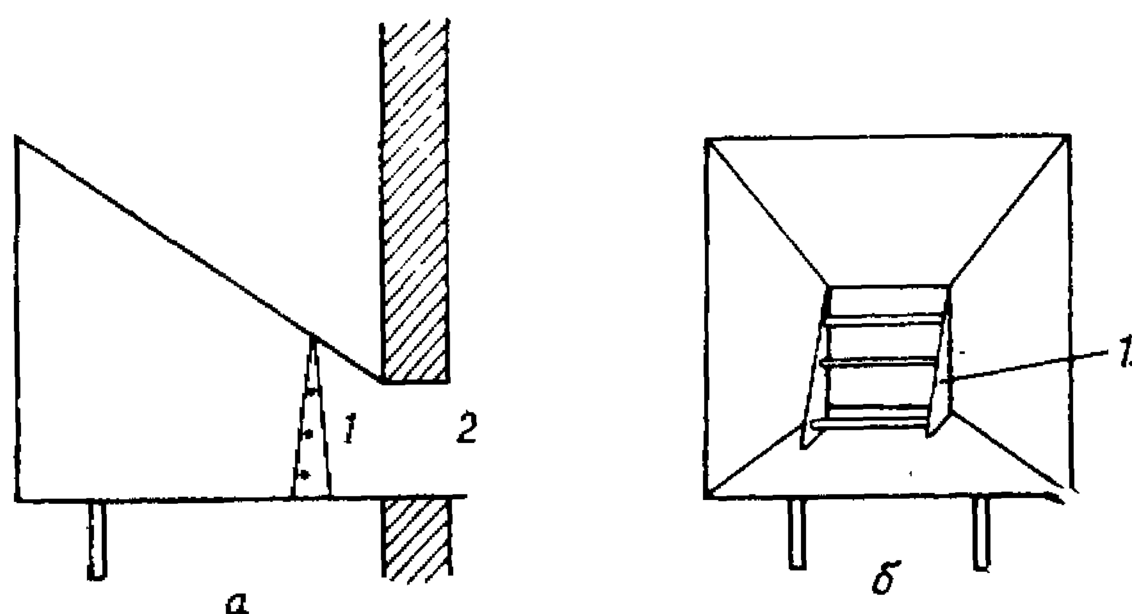


Рис. 9.8. Камера для опрыскивания тонкослойных хроматограмм.
а — вид сбоку; б — вид спереди; 1 — стойка для пластинок; 2 — отверстие, направленное к вытяжному шкафу.

ны в разд. 9.5.3) также проводят в вытяжном шкафу с хорошей тягой.

Следует отметить, что некоторые обнаруживающие реагенты образуют сильно корродирующие и ядовитые аэрозоли, поэтому опрыскивание пластинок следует вести в специальных камерах, изготавливаемых из химически стойких пластмасс (поливинилхлорида, полиэтилена), которые непосредственно присоединяют к вытяжке. Схема такой камеры представлена на рис. 9.8. Подлежащие обнаружению пластинки помещают на стойке, также изготовленной из поливинилхлорида. На такую же стойку помещают и микропластинки. Выпускаются в продажу также камеры, которые не нужно подсоединять к вытяжке при проведении опрыскивания; некоторые камеры, предназначенные для кратковременного пользования, изготавливаются даже из специальной бумаги.

Устройство для нанесения проб, шаблоны для нанесения проб и оценки размеров пятен, пульверизаторы и т. д. рассматриваются в тех разделах, в которых описываются отдельные стадии хроматографирования. В [1] содержится подробный список адресов фирм, выпускающих или поставляющих аппаратуру, сорбенты, готовые пластинки и листки для ТСХ.

9.3. ТВЕРДЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ТСХ

Правильный выбор сорбента и соответствующей элюирующей системы — это первый и наиболее важный этап решения поставленной задачи. Поэтому необходимо обстоятельно знать свойства всех типов используемых в ТСХ сорбентов. Выбрать оптимальную хроматографическую систему достаточно сложно, поскольку разделение методом ТСХ обычно совершается в результате сочетания различных механизмов, чаще всего адсорбции и распределения между фазами, а также ионного обмена или затрудненной диффузии (гель-хроматография). Однако, если условия выбраны правильно, один из механизмов разделения становится преобладающим. Если разделяемые соединения неполярны, следует создать условия, благоприятные для адсорбционной хроматографии (применение сорбента с большой адсорбционной способностью), а для разделения полярных (растворимых в воде) соединений следует использовать принципы, применяемые в жидко-жидкостной хроматографии. Наконец, при работе с ионогенными соединениями следует избрать методику ионообменной хроматографии. Очевидно, что налицо определенная аналогия с колоночной хроматографией.

Далее, выбирая сорбент и элюирующую систему, необходимо просмотреть соответствующую литературу, в частности библиографии статей в Journal of Chromatography [38] или специализированных сборниках рефератов [57]. Статистика показывает [56], что больше половины всех работ по разделению методом ТСХ выполнено на силикагеле G*, около 10% — на силикагеле без связующего, 3% — на оксиде алюминия, 9% — на целлюлозе, 2,5% — на полиамиде и 0,5% — на диатомовой земле. Остальные 21% — это работы, где применяются пропитанные слои силикагеля, слои, образованные смесью двух и более сорбентов, и т. п.

Из поставляемых фирмами сорбентов можно непосредственно приготавливать суспензии и наносить их на подложки. Эти сорбенты уже содержат, например, связующее (чаще всего гипс, крахмал, целлюлозу, поливиниловый спирт), увеличивающее адгезионную способность и прочность слоя, или индикаторы для обнаружения посредством УФ-облучения; выпускаются также сорбенты, предназначенные для препаративного разделения, особо чистые сорбенты и т. д.

9.3.1. СИЛИКАГЕЛЬ

Основные свойства и структура силикагеля, а также условия его применения описаны в гл. 4, разд. 4.2.2. Размер частиц силикагеля, предназначенного для ТСХ, меньше (2—40 мкм),

* Силикагель с добавкой гипса в качестве связующего.

Таблица 9.1

Характеристики некоторых товарных марок силикагеля для ТСХ[а]

Марка[б]	Связующее	Длина волны флуоресценции индикатора, нм	Примечание
G[в]	Гипс (13%)		
GF_{254}	Гипс (13%)	254	
H	Без связующего	—	
$HF_{254+366}$	То же	254 и 366	
HR	»	—	Особо чистый
Тип 200	»		Диаметр пор 200 Å
Тип 500	»		Диаметр пор 500 Å
Тип 1000	»		Диаметр пор 1000 Å
$60HF_{254}$ силанизованный	»	254	Гидрофобный, для распределительной хроматографии
$60PF_{254+366}$	»	254 и 366	Для препаративной ТСХ (слой толщиной до 1,5 мм)
$60F_{254}$	Гипс (30%)	254	Для препаративной ТСХ (слой толщиной до 10 мм)
$60PF_{254}$ силанизованный	Без связующего	254	Гидрофобный, для распределительной хроматографии
Адсорбосил-5-ADN	То же		Пропитан 20% нитрата серебра (фирма Applied Science)

[а] Полные наименования фирм и их адреса см. в конце главы.
[б] Обозначения, применяемые фирмой Merck.
[в] Обозначение, предложенное Шталем.

чем у частиц силикагеля, применяемого в обычной колоночной хроматографии. Размеры пор меняются от 20 до 150 Å, а удельная поверхность — от 300 до 600 м²/г. Конечно, образцы силикагеля, поставляемые различными фирмами, различаются по свойствам. От размеров его частиц зависит скорость элюирования: на силикагеле с бо́льшими частицами она выше. Сравним, например, длительность элюирования на трех образцах силикагеля с разными размерами частиц (длина пути элюирования во всех трех случаях равна 10 см): от 2 до 10 мкм — 45 мин; от 10 до 30 мкм — 15 мин и от 30 до 60 мкм — 8 мин. Однако с увеличением размеров частиц силикагеля уменьшается четкость разделения. Большинство фирм, продающих оборудование, материалы и реактивы для хроматографии, выпускает и силикагель; список адресов фирм см. в [1]. Ряд наиболее часто применяемых марок силикагеля специального назначения указан в табл. 9.1. Чаще всего используется силикагель с добавкой 5—

15% гипса в качестве связующего. В некоторые марки силикагеля вводят также флуоресцентный индикатор (сульфид кадмия или 3% силиката цинка), вызывающий флуоресценцию зеленого цвета при УФ-облучении с длиной волны 254 нм; некоторые хроматографируемые соединения обнаруживаются при этом в виде темных пятен. Сильнокислотные элюенты, особенно элюенты, содержащие минеральные кислоты, разлагают этот индикатор. В состав некоторых марок силикагеля входит также органический индикатор, реагирующий на облучение с длиной волны 366 нм (длинноволновое УФ-излучение). Недостаток этого индикатора — его растворимость, некоторые растворители могут элюировать его. На силикагеле, содержащем гипс, обычно удается получить лучшее разделение.

Чтобы нанести слой силикагеля толщиной 0,25 мм на пять пластинок размером 20×20 см, необходимо 30 г сорбента. Навеску сорбента интенсивно встряхивают в конической колбе емкостью 250 мл с 65—70 мл воды и за 2 мин наносят полученную суспензию на пластинки. Иногда рекомендуется растереть сначала сорбент с 35 мл воды в ступке, добавить оставшуюся воду к полученной однородной пасте и сразу нанести смесь на пластинки (весь процесс должен длиться не более 100 с). Для гомогенизации можно также использовать электрический смеситель.

Если наличие ионов кальция нежелательно, то можно воспользоваться силикагелем с добавкой крахмала (3%) в качестве связующего. Навеску сорбента (30 г), предназначенную для нанесения слоя на несколько пластинок, гомогенизируют в смесителе с 90 г кипящей воды. Полученную суспензию следует сразу же наносить на пластинки. Проводя обнаружение, следует также учитывать и свойства крахмала, например, нельзя применять реагенты, содержащие иод, или обугливающие реагенты. Это относится также к некоторым маркам готовых пластинок и листков для ТСХ, например к силуфолу*.

Однако благодаря очень маленькому размеру частиц силикагель и без связующего образует хорошо прилипающие слои; нарушение целостности слоя можно наблюдать только на участках пластинки, погруженных в элюент. Силикагель без связующего можно использовать почти без ограничений для хроматографирования большинства различных типов веществ. Сус-

---

* Листки силуфола 254 (производства Kavalier Glassworks) содержат слой макропористого силикагеля, приготовленного по методу Питры и Штербы [48], без индикатора или с флуоресцентным индикатором (на 254 или 366 нм), вкрапленным в макроструктуру сорбента. К этому силикагелю добавляют крахмал в качестве связующего и наносят полученную смесь на листки алюминия. Более подробные данные о свойствах и применении этого материала можно найти в рекламной литературе [52].

пензию приготавливают из 30 г сорбента и 60—65 мл воды. Суспензию не обязательно использовать сразу и можно заранее приготовить некоторый запас ее. Силикагель может также содержать добавку флуоресцентного индикатора.

Кроме обычного силикагеля, фирмы выпускают особо чистый силикагель, например HR (hoch rein — особо чистый), предназначенный для решения специальных задач. Если лаборатория не располагает таким силикагелем и если необходимо хроматографировать органические вещества с целью получения продуктов высокой степени чистоты (для ЯМР или масс-спектрометрического анализа), то поступают следующим образом. Сначала элюируют пластинку смесью полярных растворителей, следя за тем, чтобы фронт растворителя обязательно дошел до верхнего края пластинки. После этого соскабливают ту зону сорбента, на которую растворитель вынес примеси, и тщательно высушивают пластинку. На обработанной таким образом пластинке можно проводить указанное разделение.

Для обращенно-фазной хроматографии используют образцы силикагеля с химически связанными фазами (см. гл. 4, разд. 4.2.9), но без связующего. В некоторые марки такого силикагеля вводят также флуоресцентные индикаторы.

Макропористые силикагели без связующего пригодны в качестве молекулярных сит для гель-хроматографии. Для молекулярных сит с размерами пор 200, 500 и 1000 Å пределы исключения составляют соответственно $5 \cdot 10^4$, $4 \cdot 10^5$ и 10^6.

Силикагель и некоторые другие сорбенты можно пропитывать неорганическими соединениями, повышающими избирательность и эффективность разделения; перечень таких соединений содержится в табл. 9.2.

Раствор пропитывающего соединения добавляют к силикагелю на стадии приготовления суспензии, или проводят предварительное элюирование пластинки этим раствором, или по-

Таблица 9.2

Некоторые соединения, применяемые для пропитки сорбентов, и типы разделяемых на них соединений

Пропитывающие соединения	Типы разделяемых соединений	Литература
Нитрат серебра	Алкены, алкины, терпены, глицериды, жирные кислоты	40
Борная кислота, тетраборат натрия	Сахариды, глицериды, сфинголипиды	62
Нитрат свинца	Полиолы	56
Ацетат кадмия	Ароматические амины	75
Оксалат калия	2-Оксикислоты	68

гружают в него пластинки, или же опрыскивают им пластинки. Чаще всего используют для пропитки раствор нитрата серебра, хотя более поздние исследования [49] показали, что перхлорат серебра более эффективен. Пропитанные слои можно получить, используя 12,5%-ный водный раствор нитрата серебра вместо воды при приготовлении суспензии сорбента или погружая пластинку на 5—10 с в 10%-ный метанольный раствор нитрата серебра (для получения последнего сначала растворяют нитрат серебра в минимальном количестве воды, а затем добавляют к раствору нужное количество метанола).

Слои силикагеля или другого сорбента, предназначенного для распределительной хроматографии, можно пропитывать какой-либо гидрофильной или липофильной фазой. Для этого

Таблица 9.3

Некоторые фирмы, выпускающие готовые к употреблению пластинки с тонкими слоями

Фирма[a]	Фирменное наименование продукции	Сорбент	Подложка
Analtech	Юниплейт	Силикагель	Стекло
Analabs	Анасил	»	»
Applied Science	Прекотс	» Целлюлоза	»
	Пермакотс	Силикагель, спечен с подложкой	»
CAMAG	Фертигплаттен	Силикагель, оксид алюминия, целлюлоза	»
Distillation Products Industries	Хроматограм-шитс	Силикагель	Органическая пленка
Gelman Instrument	ITLC	»	Ткань из стекловолокна
Kavalier	Силуфол	»	Алюминиевая фольга
	Алуфол Люцефол	Оксид алюминия целлюлоза	
Macherey-Nagel	Полиграм	Силикагель, оксид алюминия, целлюлоза, полиамид	Органическая пленка
Merck	Фертигплаттен	Силикагель, оксид алюминия, кизельгур, целлюлоза	Стекло
Merck	ТСХ алюминиум шитс	Силикагель, оксид алюминия, целлюлоза, кизельгур, полиамид	Алюминиевая фольга
Schleicher und Schüll	Селекта фертигплаттен	Силикагель, целлюлоза, полиамид	Стекло, органическая пленка, алюминиевая фольга

[a] Полные наименования фирм и их адреса указаны в конце главы.

лучше всего дать соответствующему пропитывающему раствору подняться внутри слоя. Например, можно пропитать слой 20%-ным раствором этиленгликоля в метаноле или 5%-ным раствором парафинового масла в петролейном эфире и после этого испарить растворитель при комнатной температуре, держа пластинку в горизонтальном положении; петролейный эфир испаряется примерно за 15 мин, а метанол — примерно за 3 ч.

Выпускается также силикагель специально для препаративной ТСХ; гипса в него обычно не добавляют, но вводят один или два флуоресцентных индикатора (254 и 366 нм). Слои такого силикагеля не растрескиваются, даже если их толщина достигает 1,5 мм. Препаративное разделение можно проводить и на силикагеле, предназначенном для аналитических работ, если это достаточно узкая фракция.

Проводить разделение методом ТСХ легче, пользуясь уже готовыми пластинками, особенно если требуется высокая воспроизводимость или если хроматограммы подлежат последующему хранению. Основные типы пластинок с готовыми тонкими слоями перечислены в табл. 9.3.

9.3.2. ОКСИД АЛЮМИНИЯ

Оксид алюминия — это сорбент с четко выраженными адсорбционными свойствами (см. гл. 4, разд. 4.2.3). Он поставляется главным образом в щелочной форме (pH 8—10). Размеры частиц находятся в интервале от 5 до 40 мкм, размеры пор — от 20 до 150 Å, удельная поверхность — от 100 до 350 $м^2/г$. Некоторые марки оксида алюминия, как и некоторые марки силикагеля, выпускают с добавкой 9—10% гипса в качестве связующего; оксид алюминия, содержащий связующее, выпускают в щелочной и нейтральной (pH 7—7,5) формах, а не содержащий связующего — еще и в кислой форме (pH 4). В некоторых случаях в адсорбент этого типа вводят также флуоресцентный индикатор (254 нм). В препаративных целях применяют слабощелочной (pH 9) оксид алюминия без связующего вещества (Merck), содержащий индикатор второго типа (366 нм); из этого адсорбента можно получать слои толщиной до 1,5 мм.

Суспензию оксида алюминия обычно приготавливают, смешивая примерно одинаковые навески сорбента (без связующего) и воды или одну часть оксида алюминия (со связующим) и две части (по массе) воды. Приготовленные слои сушат при комнатной температуре и активируют, нагревая 30 мин при 110 °С. Активность обработанного таким образом оксида алюминия лежит в интервале между II и III (по Брокману), что в большинстве случаев достаточно для разделения. Еще бо-

лее высокой активности можно добиться, прокаливая пластинки 4 ч при 200 °С и выдерживая их затем 24 ч в эксикаторе над оксидом алюминия с активностью I.

9.3.3. СИЛИКАТ МАГНИЯ

В гл. 4, разд. 4.2.4, даны основные характеристики этого сорбента, близкого по качественным параметрам к силикагелю и оксиду алюминия. Силикат магния выпускают в виде частиц размером от 2 до 44 мкм; его pH равен примерно 10. Некоторые фирмы выпускают силикат магния, нейтрализованный кислотами. Обычный товарный сорбент не содержит ни связующего, ни флуоресцентного индикатора. Однако по договору с заказчиком фирма Woelm поставляет сорбент с добавкой 2% неорганического индикатора.

Суспензию для нанесения слоя толщиной 0,30 мм на ряд пластин приготавливают, смешивая 15 г силиката магния с 45 мл дистиллированной воды. Чтобы нанесенный слой высох, достаточно выдержать пластинку 2 ч при комнатной температуре, а 30-минутное прокаливание при 130 °С позволяет полностью активировать приготовленные пластинки.

Силикат магния можно использовать для разделения сахаров, их ацетатов, стероидов, эфирных масел, антрахинонов и гликозидов.

9.3.4. ПОЛИАМИДЫ

Полиамиды и целлюлоза — наиболее распространенные органические сорбенты. Полиамидные сорбенты изготавливают на основе перлона (найлона 6) или найлона 11 и 66 (см. гл. 4, разд. 4.2.7). Хроматографические свойства отдельных товарных марок полиамидов значительно различаются в зависимости от свойств исходного сырья и степени полимеризации. Поскольку в присутствии свободных аминогрупп происходит сильное связывание соединений некоторых типов, например ароматических нитросоединений и хинонов, полиамиды выпускают также в ацетилированной форме. Перлон и найлон 66 — гидрофильные материалы, найлон 11 гидрофобен. Обычно поставляемые для ТСХ полиамиды не содержат связующего, но часто содержат добавку индикатора с коротковолновой (254 нм) флуоресценцией.

Чтобы нанести слой полиамида толщиной до 0,25 мм на ряд пластинок, тщательно встряхивают 16 г порошкообразного сорбента (полиамид 6 или 66 MN, фирма Macherey-Nagel) с 65 мл дистиллированной воды. К такому же количеству найлона 11 достаточно добавить около 50 мл метанола. Слои сушат на

воздухе при комнатной температуре. При использовании полиамида фирмы Woelm суспензию приготавливают из 5 г сорбента и 45 г этанола.

Готовые к употреблению стеклянные пластинки со слоем полиамида выпускает фирма Schleicher und Schüll. Связующим в таких слоях служит крахмал, а флуоресцентным индикатором — силикат цинка в количестве 3%. Выпускают также пленку со слоем толщиной всего 0,025 мм, не содержащим связующего. Слои этих сорбентов характеризуются значительной емкостью, и их можно регенерировать несколько раз. Эти слои служат для разделения фенольных соединений, гликозидов флавоноидов, гликозидов антрахинона, нуклеозидов, пестицидов. Применение полиамидов в ТСХ рассматривается в статье Хёрхаммера [19].

9.3.5. ЦЕЛЛЮЛОЗА

Целлюлоза, как и полиамиды, относится к числу наиболее часто применяемых органических сорбентов, особенно в распределительной хроматографии. В ТСХ используют два типа целлюлозы — природную волокнистую и микрокристаллическую. Длина волокон природной целлюлозы составляет от 2 до 25 мкм, а средняя степень полимеризации колеблется между 400 и 500. Частицы микрокристаллической целлюлозы крупнее — от 20 до 40 мкм, а средняя степень полимеризации ниже — между 40 и 200. Благодаря применению очень коротких волокон целлюлозы в форме порошка в ТСХ не получается такое быстрое растекание хроматографируемых веществ вдоль волокон, которое имеет место на целлюлозе, используемой в виде хроматографической бумаги, и поэтому при одних и тех же концентрациях ТСХ дает более четкие пятна и позволяет получить лучшее разделение, чем БХ. Микрокристаллическая целлюлоза химически чище, чем природная целлюлоза, хотя некоторые марки последней, например MN 300 HR, вполне сравнимы по чистоте с микрокристаллической целлюлозой. На чистой целлюлозе проводят главным образом количественный анализ или разделение фосфорных кислот, фосфатов и т. п. Большинство марок товарной целлюлозы выпускают без связующего, поскольку адгезионные свойства ее слоев намного выше, чем у неорганических сорбентов. В некоторые марки этого адсорбента добавляют флуоресцентный индикатор. Добавка гипса может даже оказать отрицательное влияние, как, например, при разделении аминокислот, но иногда может и улучшить разделение.

Приготовливая слои, необходимо строго следовать рекомендуемой методике. Например, 15 г целлюлозы MN300 гомогенизируют с 90 мл дистиллированной воды в электрическом смеси-

геле в течение 30—60 с и наносят полученную пасту на пластинки слоем толщиной 0,25 мм. Последующую сушку слоя ведут при комнатной температуре. В процессе сушки толщина слоя уменьшается примерно вдвое, так что конечная его толщина составляет 0,125 мм, т. е. полученный слой наиболее удобен для аналитического разделения. При хранении таких слоев на воздухе хроматографические свойства их улучшаются. Допускается также 15-минутная сушка при 105 °С.

15—20 г микрокристаллической целлюлозы авицел гомогенизируют со 100 мл дистиллированной воды всего одну минуту. Нанесение и сушка проводятся так же, как описано выше. Если целлюлоза содержит 3% силиката цинка в качестве флуоресцентного индикатора, то гомогенизацию следует проводить в метаноле. Например, 25 г целлюлозы DC пульвер 144 (фирма Schleicher und Schüll), 40 мл метанола и 20 мл воды гомогенизируют в течение 30 с, нанесенные слои сушат на воздухе при комнатной температуре или 30 мин при 110 °С.

Такие слои используют для распределительной хроматографии гидрофильных веществ, например спиртов, аминокислот, природных красителей, сахаров, фосфатов и т. д.

АЦЕТИЛИРОВАННЫЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Ацетилированные целлюлозы (с различной степенью ацетилирования) также используются, хотя и очень редко, в хроматографии, главным образом обращенно-фазной (см. разд. 9.8.9). Максимальное содержание ацетильных групп составляет 44,8%, что соответствует триацетату. Ацетилированная целлюлоза растворяется в ряде галогенсодержащих растворителей, диоксане, кетонах и сложных эфирах; она сильнее подвержена разрушающему действию обнаруживающих реагентов. Адгезионные свойства ацетилированной целлюлозы хуже, чем у неацетилированной, поэтому, приготавливая из нее тонкие слои, необходимо применять связующее.

Приведем типичную методику. 30 г ацетилцеллюлозы DC пульвер 144/21 (фирмы Schleicher und Schüll) смешивают с суспензией 4,5 г гипса в 60 мл воды и 10 мл метанола, гомогенизируют эту смесь 30 с в электрическом смесителе. Чтобы удалить из суспензии пузырьки воздуха, поверх нее наливают 2—3 мл метанола и затем встряхивают. Готовую суспензию следует нанести на пластинки в течение 10 мин. Сушат полученные слои при комнатной температуре или при 110 °С в течение 30 мин.

Ацетилированные целлюлозы используют главным образом для обращенно-фазной хроматографии липофильных соединений — антрахинонов, антиоксидантов, нитрофенолов, пероксидов, заменителей сахара.

9.3.6. ИОНООБМЕННИКИ

Сорбенты с ионообменными свойствами используются в ТСХ все чаще и чаще (см. гл. 5, разд. 5.2.2). Первыми ионообменниками, нашедшими применение в ТСХ, были модифицированные или пропитанные жидкими ионообменниками целлюлозы, а также ионообменники на основе полистирола, например дауэкс-1 или дауэкс-50 с целлюлозой в качестве связующего, поскольку сами ионообменники не удерживаются на пластинках.

Способы приготовления, свойства и структура ионообменников на основе целлюлозы рассматриваются в разд. 5.2.3 гл. 5. Расстояние между активными группами на поверхности макромолекул целлюлозы составляет примерно 50 Å в то время, как в ионообменных смолах оно равно примерно 10 Å. Ионообменные целлюлозы, обладающие меньшей ионообменной способностью, чем ионообменные смолы, превосходят последние по ионообменной способности в отношении белков и других макромолекулярных соединений. Из-за больших расстояний между активными группами в целлюлозе используется только небольшая часть активных центров, так что избирательная десорбция может проходить в очень мягких условиях по сравнению с хроматографией на ионообменных смолах. Этим и объясняется предпочтительность ацетилированных целлюлоз как ионообменников при биохимических исследованиях и очистке высокочувствительных соединений. Основные типы ионообменных производных целлюлозы приведены в табл. 9.4.

Типичный способ приготовления слоев для ТСХ состоит в следующем. Порошкообразный товарный целлюлозный ионообменник гомогенизируют с 5—10-кратной навеской дистиллированной воды и наносят полученную массу на пластинки слоем толщиной 0,25—0,5 мм. Поскольку такие материалы сильно набухают, более толстые слои легко растрескиваются при сушке. Чтобы избежать этого, рекомендуется добавлять к приготовленной суспензии порошок целлюлозы. Последующую сушку проводят при комнатной температуре. Перед употреблением слои необходимо промыть. С этой целью пластинку помещают одним концом в 10%-ный водный раствор хлорида натрия и дают ему подняться по слою на 5—10 см. После этого переносят пластинку, не просушивая ее, в камеру с чистой водой, где продолжают пропитку, пока фронт растворителя не достигнет верхнего края слоя. Затем пластинку сушат 2—3 ч и вновь таким же образом промывают водой до самого верха. Промытую пластинку оставляют при комнатной температуре до следующего дня.

Ионообменники на основе полидекстрана (сефадекс, см. разд. 6.2.2) похожи по свойствам на ионообменники на основе

Таблица 9.4

Ионообменники на основе целлюлозы и полидекстрана для ТСХ

Порошки

Марка ионообменника	Состав	Тип	Емкость, мэкв./г	Фирма
CM	Карбоксиметилцеллюлоза	Катионообменник	0,7	Macherey-Nagel, Whatman
DEAE	Диэтиламиноэтилцеллюлоза	Анионообменник	0,7—1,0	То же
ECTEOLA	Продукт реакции эпихлоргидрина, триэтаноламина и щелочной целлюлозы	То же	0,3—0,5	» »
P	Фосфорилированная целлюлоза	Катионообменник	0,7	» »
PEI	Целлюлоза, пропитанная полиэтиленимином	Анионообменник	1,0	Macherey-Nagel
Poly-P	Целлюлоза, пропитанная полифосфатом	Катионообменник	1,0	» »
SE-сефадекс (C-25; C-50)	Сульфоэтилсефадекс	То же	2,3	Pharmacia
CM-сефадекс (C-25; C-50)	Карбоксиметилсефадекс	»	4,5	»
DEAE-сефадекс (C-25; C-50)	Диэтиламиноэтилсефадекс	»	3,4	»

Готовые слои

Марка ионообменника	Модификация	Подложка	Толщина слоя, мм	Фирма[a]
PEI	Выпускается также с флуоресцентным индикатором (254 нм)	Стекло или органическая пленка	0,1	Schleicher und Schüll
PEI	—	Органическая пленка	0,1	Macherey-Nagel
PEI	Выпускается также с флуоресцентным индикатором (254 нм)	Органическая пленка или алюминиевая фольга, стекло	0,1	Merck

[a] Полные названия фирм и их адреса даны в конце главы.

целлюлозы. Декстрановые ионообменники, предназначенные для ТСХ, выпускают в виде очень мелких гранул (10—40 мкм), см. табл. 9.4.

Ионообменные смолы обычно наносят на пластинки в виде смесей с целлюлозой (ср. [32]). В этих целях можно использовать большое число товарных продуктов (см. гл. 5, разд. 5.6) с гранулами размером 40—80 мкм, например дауэкс-50. Его сначала переводят в требуемую форму, после этого смешивают в ступке 5 г порошка целлюлозы MN300 с несколькими миллилитрами дистиллированной воды и к этой смеси небольшими порциями добавляют при перемешивании суспензию 30 г ионообменника в 20—30 мл воды. В заключение добавляют еще 25 мл воды. Полученную суспензию наносят слоем толщиной 0,25 мм и сушат при комнатной температуре. Приготовленные пластинки хранят в закрытой коробке, причем их надо обязательно использовать в течение недели. Некоторые фирмы выпускают готовые слои ионообменников, нанесенные на гибкую фольгу (см. табл. 9.5). Перед употреблением их нужно выдержать 16 ч с соответствующим буферным раствором (см. разд. 9.8.3). Эти пластинки применяют в тех же целях, что и слои с целлюлозными ионообменниками, например для разделения аминокислот, нуклеотидов, пуринов, пиримидинов, неорганических ионов, антибиотиков и т. п.

Таблица 9.5

Марки фольги с нанесенными ионообменными смолами, выпускаемые фирмой Chinoin[а]

Марка[б]	Тип	Форма
Фиксион 50×8	Сильный катионообменник (SO_3^-)	Na^+-форма
Фиксион 2×8	Сильный анионообменник —$N(CH_3)_2 \cdot CH_2OH$	CH_3COO^--форма
Фиксион 2×8 UV_{254}	Сильный анионообменник с индикатором УФ-излучения (254 нм)	CH_3COO^--форма

[а] Полное название фирмы и ее адрес даны в конце главы.

[б] Фирма Macherey-Nagel выпускает фольгу таких же типов под названиями: ионекс-25 SA-Na, ионекс-25 SB-Ac, ионекс-25-Ac/UV_{254}.

Для разделения некоторых катионов методом ТСХ в качестве неорганических ионообменников используются фосфат циркония (IV), молибдат аммония и другие соли. Эти материалы поставляются фирмой Bio-Rad Labs в соответственно гранулированном виде (2—44 мкм). Способ приготовления слоев описан в монографии [11].

9.3.7. МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИИ

Хроматографические материалы для гель-хроматографии, их назначение и структура подробно описаны в гл. 6. При соответствующей степени грануляции и применении надлежащей методики их также можно использовать для приготовления тонких слоев. Полная информация о декстрановых гелях марки «сефадекс суперфайн», поставляемых фирмой Pharmacia, содержится в выпущенной этой фирмой рекламной брошюре [2]. Выбранный гель оставляют набухать в жидкой среде в течение рекомендованного промежутка времени, после чего суспензию геля наносят в виде слоев толщиной 0,5 мм с помощью соответствующего приспособления. Чтобы в системе установилось равновесие, пластинки с нанесенным слоем помещают в специальную камеру (рис. 9.6). В разд. 9.2.2 кратко изложен метод приведения системы в равновесие. В работе [66] описано разделение пуриновых и пиримидиновых оснований и нуклеотидов по упрощенной методике на смеси 16 г сефадекса G-10 с 4 г силикагеля GF_{254} или 4 г целлюлозы. Приготовленный слой сохраняет разделяющие свойства сефадекса, но прочность его повышается, становится примерно такой же, как у слоев силикагеля или целлюлозы.

Для ТСХ пригодны также биогели Р — гели полиакриламида, выпускаемые фирмой Bio-Rad Labs. (см. гл. 6, разд. 6.2.3). Эта же фирма выпускает неорганический сорбент биоглас с пятью заданными интервалами размеров пор (от 200 до 2500 Å), пригодный для гель-хроматографии белков, вирусов, сахаридов и липидных комплексов.

9.3.8. ДРУГИЕ СОРБЕНТЫ

Помимо перечисленных выше сорбентов в ТСХ применяют иногда и другие материалы, причем в некоторых случаях их используют в смеси с более распространенными сорбентами. Из числа неорганических сорбентов используют диатомовую землю (кизельгур), адсорбционная способность этого сорбента мала, но он хорошо удерживает неподвижные жидкие фазы, что очень важно в распределительной хроматографии. Роль сорбентов в ТСХ могут также выполнять оксиапатит, оксид магния и активный древесный уголь [51]. Близким по свойствам к полиамиду является поли-N-винилпирролидон, используемый для разделения хлорогеновых кислот и других фенольных соединений [9]; в качестве связующего в сочетании с этим сорбентом применяли сульфат кальция.

Анасил — выпускаемая фирмой Analabs смесь силикагеля и 15% оксида магния со связующим (10% гипса) или без не-

го — проявляет хорошую разделительную способность в отношении липидов, которые не удается разделить на чистом силикагеле [25]. Однако смешение сорбентов с различными свойствами не всегда способствует улучшению разделения. Так, использование смеси силикагеля и оксида алюминия для разделения циклодекстринов особых преимуществ не дало [74]. Авторы работы [68] исследовали разделение соединений различной полярности на смеси силикагеля с целлюлозой (1 : 1) при двумерном элюировании. При элюировании водными растворами активным компонентом была целлюлоза, а при элюировании органическими растворителями целлюлоза была инертной и в разделении принимал участие только силикагель.

9.4. ЭЛЮЕНТЫ ДЛЯ ТСХ

Итак, как мы могли убедиться, в качестве неподвижной твердой фазы в ТСХ применяются самые различные материалы, более того, механизмы разделения осуществляемого этим методом, также могут быть совершенно разными, поэтому обобщить свойства применяемых в ТСХ отдельных растворителей и их смесей довольно сложно. Соотношение между природой разделяемых соединений и растворяющей системой обсуждалось в гл. 3, а элюенты, используемые для различных типов хроматографии, и их соотношение с сорбентами и разделяемыми соединениями рассматривалось в гл. 4—6. При выборе растворителя или смеси растворителей для ТСХ следует учитывать растворимость хроматографируемых соединений в подвижной фазе, а также «растворяющую силу» (полярность) растворителя или его избирательность. О влиянии полярности растворителя на процесс адсорбции говорилось в гл. 4, разд. 4.3. На рис. 9.9 показан состав различных смесей растворителей одинаковой полярности. Под избирательностью данного растворителя по сравнению с другим растворителем почти такой же полярности подразумевают способность первого избирательно растворять один из компонентов смеси. В статье Снайдера [58] дается классификация 82 растворителей. Общие соотношения между хроматографируемыми соединениями, элюирующей системой и природой слоя сформулированы Германеком [18]. При разделении методом ТСХ чистота растворителей, безусловно, имеет такое же важное значение, как и при разделении другими хроматографическими методами.

Используя двойные и тройные смеси растворителей, следует помнить о возможности расслоения этих смесей и образования второго фронта растворителя вследствие контакта с неподвижной фазой [71].

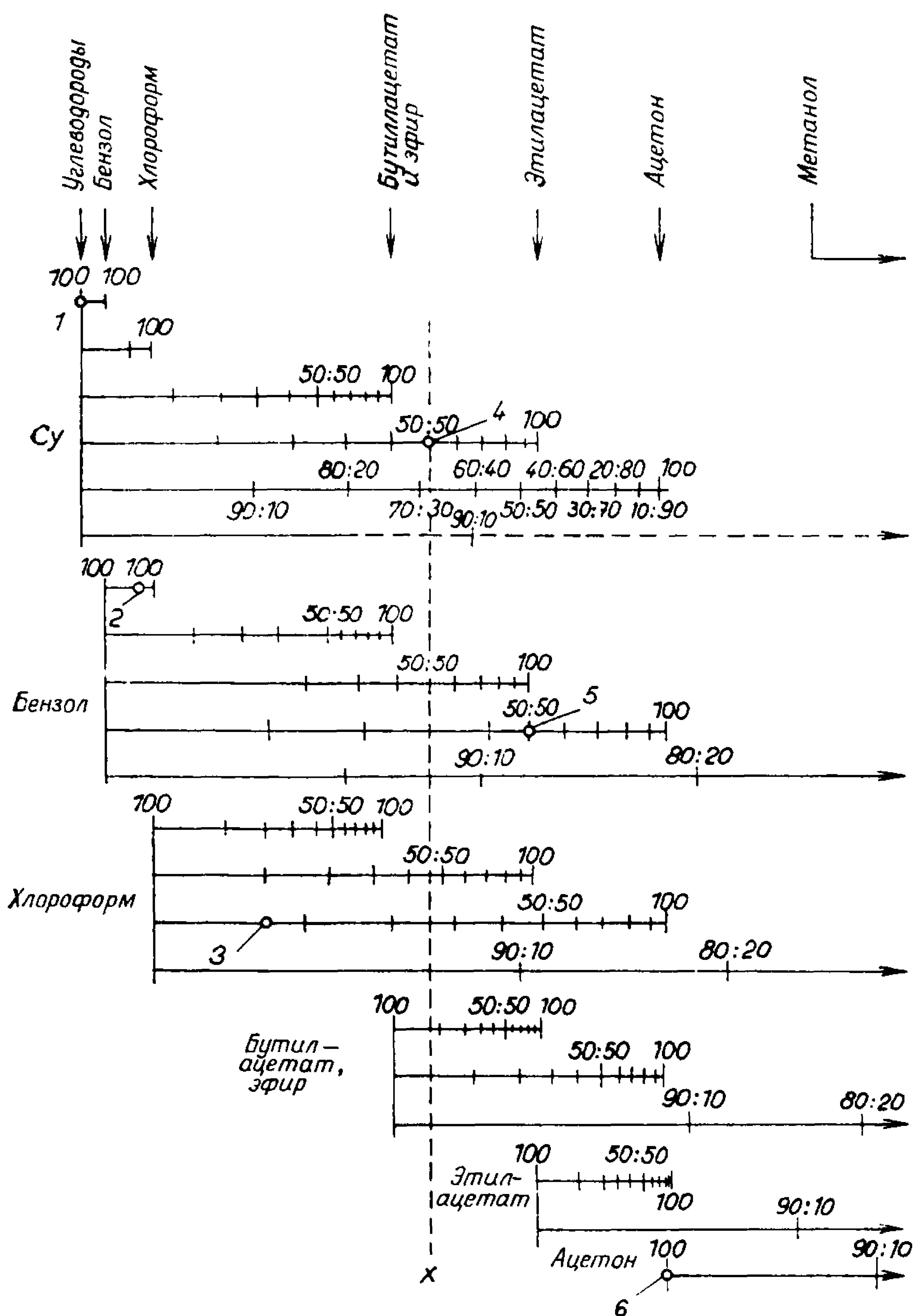


Рис. 9.9. Эквиэлюотропные ряды [42].

Полярность растворителей возрастает слева направо. Эквиэлюотропные ряды находятся на вертикальных прямых линиях, параллельных штриховой прямой линии *x*; данные справедливы для N-камеры с насыщенной атмосферой.

9.5. МЕТОДИКА ТСХ

9.5.1. НАНЕСЕНИЕ ПРОБ

В большинстве случаев пробы наносят в виде растворов в подходящем низкокипящем (50—100 °С) растворителе, который должен быть относительно неполярным, чтобы хроматографируемые соединения имели бы в нем низкие значения R_f. Растворы проб наносят в виде пятен на хроматографические пластинки посредством микрошприцев или микропипеток различных типов, начиная от калиброванных пипеток, используемых в гематологии, и до самозаполняющихся пипеток известной емкости. Пробы для количественных определений рекомендуется наносить с помощью прецизионных микрошприцев. Воспроизводимость количества нанесенной пробы изменяется от $v = \pm 0,6\%$ до $v = \pm 0,8\%$ [23], где

$$v = \pm 100 s/\bar{x} = \pm 100 \sqrt{\Sigma (x - \bar{x})^2/(n-1)}/\bar{x},$$

где v — коэффициент погрешности, s — стандартное отклонение (средняя квадратичная погрешность), x — измеренное значение, $\bar{x}$ — среднее значение, n — число измерений.

Концентрация пробы в растворе составляет 0,1—1%. Объем нанесенной пробы подбирают в зависимости от чувствительности обнаружения; обычно он составляет 1—10 мкл, хотя иногда наносят и бо́льшие количества. Рекомендуется, однако, наносить как можно меньшее количество пробы; четкость разделения при этом увеличивается, а форма нанесенных пятен приближается к идеально круглой. Пробу наносят на расстоянии 1,5—2 см от нижнего края хроматографической пластинки, лучше всего с помощью прозрачного пластмассового шаблона для нанесения проб, так как в этом случае пробы располагаются на одной прямой и интервалы между ними равны. Расстояние между нанесенными пробами зависит от числа проб, но обычно составляет от 1,5 до 2 см. Для микроопределений расстояние между отдельными пробами может быть меньше. При нанесении пробы следует осторожно коснуться поверхности слоя кончиком пипетки и дать раствору впитаться в слой. Пробы можно наносить в виде или круглых пятен, или коротких узких полосок. Нанесение проб в виде точек может иногда привести к чрезмерному концентрированию нанесенных соединений, особенно если они растворены в неполярном растворителе, а в итоге — к образоваию «хвостов», особенно при хроматографировании в таких системах, где хроматографируемые соединения плохо растворимы. В этих случаях рекомендуется нанести на концентрированное пятно каплю более полярного растворителя, или распределить пробу по большей площади, или

наносить пробы в виде полосок. Опыт показывает, что нанесение проб полосками дает лучшие результаты, т. е. повышает четкость разделения. Нанесение проб в виде полосок рекомендуется проводить также в микропрепаративной и препаративной ТСХ, когда применяются автоматические струйные аппликаторы для нанесения проб (описаны далее в разд. 9.7.2). Иногда можно наносить пробу на стартовую линию в виде порошка или в виде среза растительной ткани [63].

В особых случаях, в частности при проведении рутинного качественного анализа лекарственных средств, обращение с которыми затруднительно (например, мазей, эмульсий, пластырей, эфирных масел [64]), пробы наносят по методу Шталя (так называемый метод TAS, Thermomikroabtrenn-und Auftrageverfahren von Substanzen, — метод термомикровыделения и нанесения веществ). Исследуемую пробу вводят в трубку из твердого стекла, которая с одного конца оттянута в короткий капилляр, а с другого может закрываться. Полученный таким образом «патрон» помещают в предварительно нагретый до требуемой температуры алюминиевый блок таким образом, чтобы короткий капилляр выступал из блока. Соединения, летучие при данной температуре, испаряются или возгоняются непосредственно на приготовленную хроматографическую пластинку. Если поместить за пробой смоченный водой крахмал или дезактивированный (гидратированный) силикагель, то такое приспособление можно использовать для микроперегонки с паром; при этом крахмал или силикагель служат микрогенераторами пара. Нанесенные на пластинку пробы обычно обозначают номерами, которые с помощью иглы записывают на слое в верхней части пластинки, над фронтом растворителя.

9.5.2. ВЫБОР ЭЛЮИРУЮЩИХ СИСТЕМ И МЕТОДЫ ЭЛЮИРОВАНИЯ

В ТСХ растворитель или система растворителей осуществляет перенос хроматографируемых соединений. Подбор растворителя позволяет регулировать значения R_f разделяемых соединений таким образом, чтобы они не оказались ни слишком малы, ни слишком велики. Выбирая растворитель, обычно пользуются элюотропными рядами. Растворитель оказывает определенное влияние на избирательность сорбции, т. е. на отношение констант распределения (коэффициентов распределения) K_1/K_2 разделяемых соединений и на разделительную способность слоев сорбента. Снайдер [59] разработал количественную теорию, объясняющую роль растворителя в хроматографическом процессе. В этой главе мы ее рассматривать не будем, а тем, кто интересуется этими проблемами, порекомендуем отличную монографию Гейсса [16], в которой все параметры ТСХ

весьма четко проанализированы на соответствующих фактических примерах. Вообще говоря, при подборе элюирующих систем следует различать два типа разделения: а) разделение смесей соединений с очень близкими или даже одинаковыми значениями R_f и б) разделение многокомпонентных смесей соединений, значительно различающихся по полярности.

Способы подбора оптимальных условий разделения смесей указанных типов различны. Подбирая оптимальные условия, можно менять не только растворители, но и сорбент, а в случае адсорбционной хроматографии можно также изменять ак-

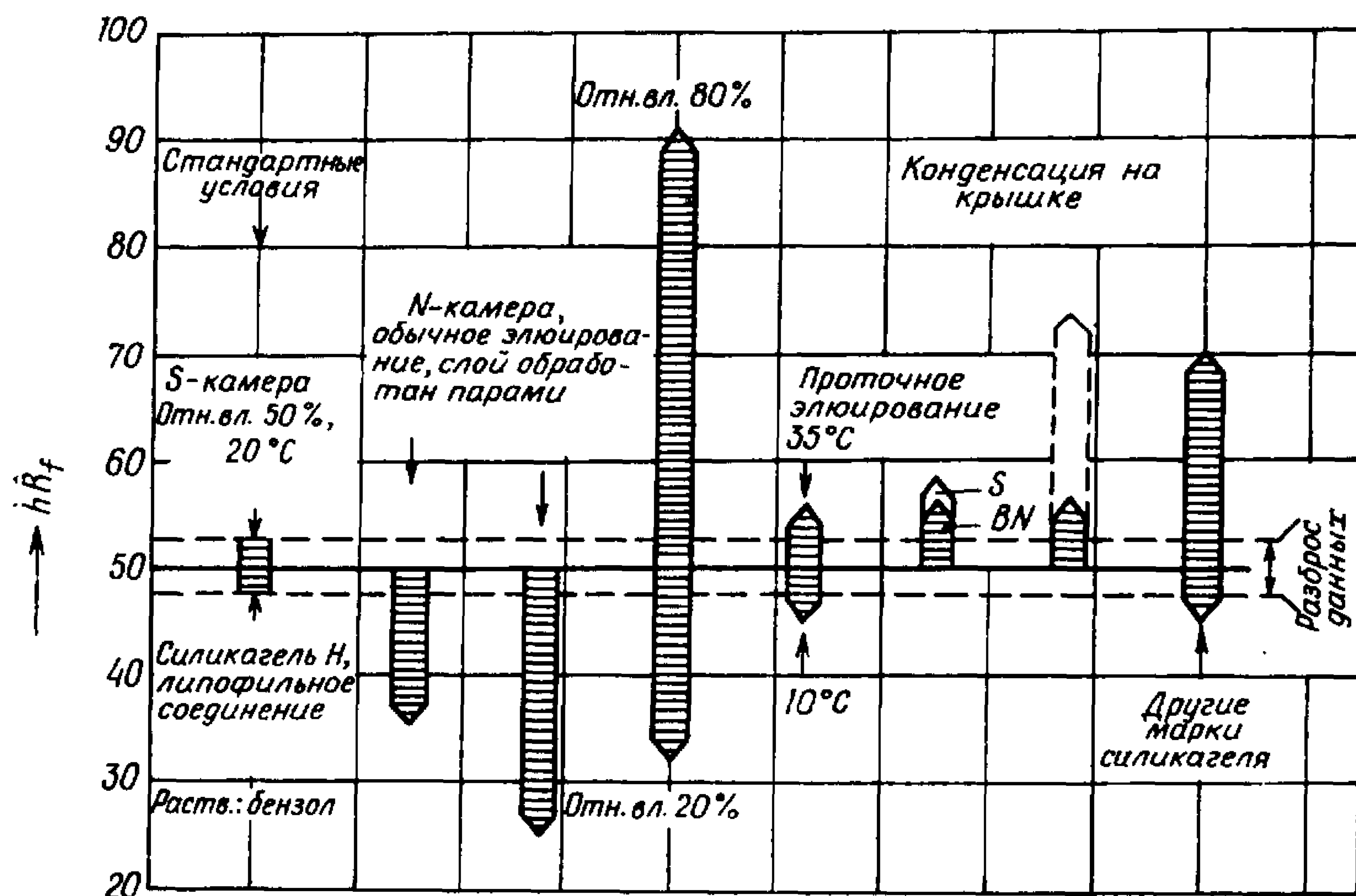


Рис. 9.10. Влияние различных условий хроматографирования на величину R_f данного соединения [17].

тивность сорбента. На рис. 9.10 ясно показано влияние условий хроматографирования на величины R_f исследуемых соединений. Схема подбора условий разделения соединений с очень близкими значениями R_f дана в табл. 9.6.

Исследуя многокомпонентную смесь, необходимо помнить, что достаточно четко разделить соединения с близкими значениями R_f и одновременно разделить соединения с большими различиями в полярности обычно не удается. Для разделения пар соединений с близкими R_f очень эффективно проточное (непрерывное) элюирование, но оно совершенно непригодно для разделения соединений, значительно различающихся по полярности. С целью разделения многокомпонентных смесей соединений различной полярности очень рекомендуется применение антипараллельных градиентов, т. е. использование систем, в ко-

Таблица 9.6

Схема подбора оптимальных условий разделения соединений с близкими величинами R_f [16]

а. Прежде всего следует попытаться найти в руководствах аналогичные примеры и, используя их, подобрать сорбент и систему растворителей. Если никаких похожих примеров найти не удается, хроматографирование ведут на любом сорбенте (силикагель, оксид алюминия)

б.[а] Если разделяемые соединения располагаются близко к стартовой линии или фронту растворителя ($R_f<0{,}05$ или $R_f>0{,}85$), то необходимо по возможности испытать различные однокомпонентные системы. На этой стадии работы очень эффективно применение варио-KS-камеры, где можно задать ортогональный градиент активности слоя

в. Если с помощью методики *б* удалось осуществить лишь частичное разделение, т. е. если в определенном растворителе удалось получить только знак разделения, то следует подобрать в варио-KS-камере такие условия, чтобы R_f равнялась примерно 0,3 при ортогональном градиенте активности слоя

г. Если при R_f примерно 0,3 разделение существенно улучшилось, можно надеяться, что проточное элюирование еще более улучшит его. Остальные условия (состав растворителя, влажность) при этом необходимо сохранить

д. Если стадия *г* не привела к улучшению разделения, то можно еще попытаться насытить слой парами растворителя. При образовании ортогонального градиента меняют состав и концентрацию использованной для насыщения системы растворителей. Входящие в состав смеси растворители должны сильно различаться по своей полярности (например, неполярный растворитель с очень малой добавкой сильно полярного растворителя)

е. После этого можно с помощью метода проточного элюирования получить частичное разделение. Этот метод особенно эффективен при разделении соединений с R_f 0,1—0,5, полученными после однократного элюирования. Если R_f выше, то для проточного элюирования его надо уменьшить (применить более слабые элюенты или более активные слои сорбента)

ж. Заменить сорбент или изменить условия его пропитки и повторить операции *б — е*

з. Оптимизировать разделение на высокоэффективном жидкостном колоночном хроматографе

[а] Стадии *б—е* всегда соответствуют одному элюированию.

торых подвижность соединения уменьшается в направлении элюирования. Антипараллельные градиенты можно получить с помощью: а) многозональной ТСХ в камерах с ненасыщенной атмосферой; б) предварительного насыщения камеры водяным паром или парами растворителя, обладающего дезактивирующими свойствами; в) создания градиента состава слоя.

Как правило, элюирование на пластинках проводят под прямым углом к направлению нанесения слоя.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ЭЛЮИРОВАНИЯ

а. Нисходящее элюирование применяется главным образом при разделении на слоях сефадекса, который не впитывает растворитель под действием капиллярных сил. При проведении

нисходящего элюирования, как правило, в верхней части камеры помещают лоток с растворителем, соединенный с тонкослойной пластинкой (расположенный наклонно или вертикально) фитилем из фильтровальной бумаги.

б. Двумерное элюирование. Аналогичный метод применяют в БХ, например для идентификации аминокислот. Готовят три квадратные пластинки, на них наносят (в углу пластинки) исходную смесь и все три пластинки элюируют в одном направлении одной и той же системой растворителей. После сушки каждую пластинку элюируют во втором направлении, перпендикулярно первому, используя три различные системы растворителей, подобранные так, чтобы каждая система хорошо раз-

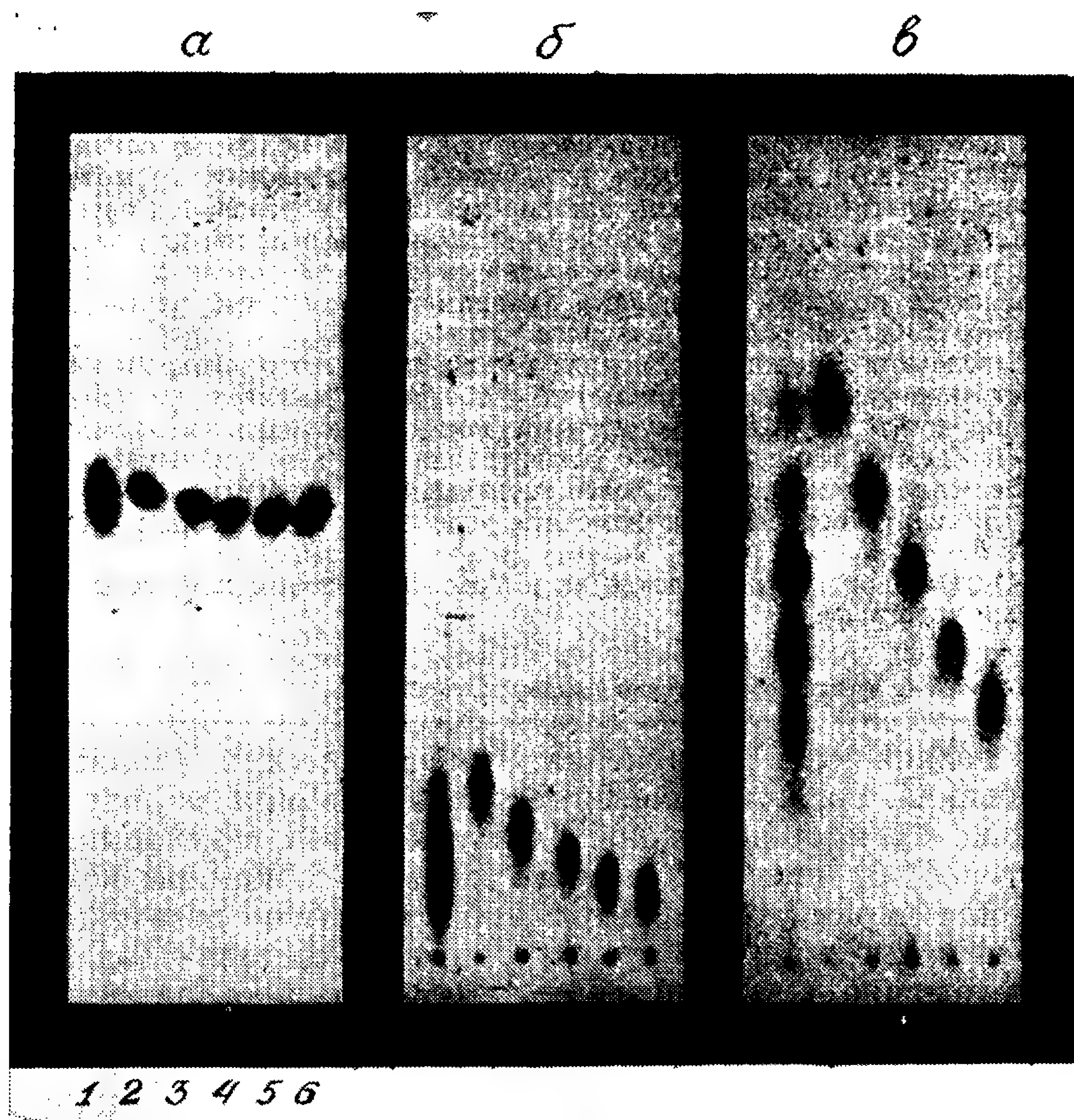


Рис. 9.11. Метод элюирования смеси сложных эфиров воска [41].
а — простое элюирование (гексан — эфир, 95 : 5); б — простое элюирование (гексан — тетрахлорметан, 50 : 50); в — пятикратное элюирование (гексан — тетрахлорметан, 50 : 50).

деляла аминокислоты определенной группы или изменяла порядок их расположения на хроматограмме.

в. Проточное элюирование. Наиболее простой вариант этого метода — свободное испарение растворителя с края пластинки. Очень эффективно использование варио-KS-камеры или другой камеры фирменного изготовления, в которой предусмотрено непрерывное удаление перемещающегося по слою растворителя у края пластинки. На рис. 9.11 показаны хроматограммы, полученные одним из упрощенных вариантов метода проточного элюирования — многократным элюированием менее полярным растворителем. Перри и др. [24а, 47] описали методику программированного автоматизированного элюирования этим способом.

г. Двузональное и *многозональное элюирование* используется при хроматографировании сложных смесей, содержащих компоненты с сильно различающейся полярностью. В результате вследствие расслоения подвижной фазы образуются два или большее число фронтов растворителя (так называемые α-фронт с α-зоной, β-фронт с β-зоной).

д. Градиентное элюирование — метод, допускающий локальное изменение условий разделения на разделяющей поверхности. Созданный градиент или остается постоянным в течение всего элюирования, или меняется вдоль пути разделения. В принципе можно постепенно менять все параметры ТСХ, создавая таким образом их градиенты. В частности, можно менять толщину и состав слоя, пропитывать его жидкими, твердыми или газообразными соединениями, менять активность, состав элюента и подвижной фазы внутри слоя и т. д.

9.5.3. ОБНАРУЖЕНИЕ

Большинство хроматографируемых соединений бесцветно, и поэтому их надо каким-то образом обнаруживать после элюирования. Методы обнаружения можно разделить на несколько групп.

ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ

Методы этой группы применяются для обнаружения соединений, флуоресцирующих при облучении светом определенной длины волны, и нефлуоресцирующих соединений, разделенных на слоях адсорбента, содержащих флуоресцентные индикаторы (обычно флуоресценция вызывается облучением с длиной волны 254 или 254 и 366 нм). В последнем случае при УФ-облучении флуоресцирует вся неподвижная фаза, за исключением зон соединений, подавляющих флуоресценцию; эти соединения обнаруживаются в виде темных пятен на флуоресцирующем фо-

не. К данной группе методов относятся также авторадиография, сцинтилляционные методы или методы прямого счета, применяемые для обнаружения радиоактивных элементов.

ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ

Химические методы обнаружения применяются чаще всего. При обнаружении указанными методами хроматограмму после окончания разделения обрабатывают газами, например аммиаком, бромом, иодом или опрыскивают различными неспецифическими или специфическими обнаруживающими реагентами. В главе, посвященной бумажной хроматографии, указаны распространенные типы пульверизаторов для опрыскивания (см. гл. 3, рис. 3.11). Реагентов для опрыскивания известно очень много, большинство их используется и в БХ. Некоторые из наиболее важных реагентов перечислены в разд. 9.9. Обнаружение с помощью химических реагентов очень эффективно, поскольку они часто образуют окрашенные производные сразу при опрыскивании или в процессе последующего нагревания, которое может проводиться при температуре, превышающей 100 °С. Иногда в процессе нагревания можно наблюдать характерное изменение окраски, что также позволяет качественно идентифицировать некоторые соединения.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ

В эту группу входят методы обнаружения биологически активных соединений. В биоавтографических методах при обнаружении стимуляторов роста или витаминов определяется степень роста зон микроорганизмов, а при обнаружении антибиотиков или антиметаболитов — степень их ингибирования. К сожалению, эти весьма специфические методы требуют очень много времени — от нескольких часов до нескольких дней. Обнаруживаются такими методами только биологически активные соединения, причем неактивные соединения обнаружению не мешают. Чтобы ускорить получение результатов, обычно проводят обнаружение одним из химических методов, после чего проводят биологическую пробу.

КОМБИНИРОВАННЫЕ МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ

Обнаружение комбинированными методами позволяет получить значительно больше информации об исследуемом соединении. Некоторые из этих методов позволяют получить данные о строении соединений или могут использоваться для количественных определений. УФ-спектры поглощения и спектры флуоресценции [23] можно получить, непосредственно исследуя хроматограммы; с помощью специально сконструированно-

го электрода можно получить полярограмму без предварительного элюирования [14]; разработаны также детекторы для измерения интенсивности флуоресценции тонкослойных хроматографических пластинок под действием рентгеновского излучения [20].

Помимо прямых методов можно использовать и непрямые методы обнаружения; можно, например, сочетать ТСХ с масс-спектрометрией [43], УФ- с ИК-спектроскопией, ГЖХ и т. п. Однако во всех случаях необходимо сначала экстрагировать пробу с хроматограммы и освободить экстракт от примесей, попавших в него из неподвижной фазы. Среди методов этой группы наилучшим оказался метод Wick-Stick [15], который позднее был несколько модифицирован [65]. Извлеченный из слоя сорбента микроэкстракт фильтруют через тонкоизмельченный бромид калия, который помещают в трубку длиной 8 см с внутренним диаметром 1 мм. Когда экстракт вводят в трубку, туда засасывают также небольшое количество чистого растворителя, потом отрезают нижний конец трубки, где концентрируются примеси. После этого можно снимать масс-спектр экстракта или же прессовать из бромида калия таблетки и снимать ИК-спектр хроматографируемых соединений.

9.6. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Методы количественного определения подразделяются на непрямые и прямые. В первую группу входят все методы, предусматривающие экстракцию соединений перед количественным их определением. Эти методы предпочтительны в тех случаях, когда можно провести контрольный опыт с холостой пробой, а также определить погрешность элюирования. В табл. 9.7 указаны различные количественные методы исследования экстрактов и указаны интервалы чувствительности отдельных методов.

Таблица 9.7

Методы количественного определения после экстракции с тонких слоев [24]

Определяемые количества соединений	1—100 мг	10—100 мкг	10—100 нг
Методы определения	Гравиметрия, титрометрия, поляриметрия	Спектроскопия (УФ, ИК, ЯМР), масс-спектрометрия, рефрактометрия, полярография, ГЖХ, изотопные методы	Флуоресценция, фосфоресценция, биологические методы

Элюирование отдельных соединений с хроматограммы следует проводить после их обнаружения на хроматографической пластинке, которое не должно нарушать целостность слоя, и количественного отделения сорбента от пластинки. Для количественного элюирования непосредственно с хроматограммы, без соскабливания сорбента, пригоден набор CAMAG-Eluchrom, выпускаемый фирмой CAMAG (рис. 9.12). С помощью этого набора можно одновременно элюировать шесть проб, получая точно измеренные конечные объемы растворов. Единственное условие — расстояние между пятнами должно быть равно



Рис. 9.12. Набор GAMAG Eluchrom для количественного автоматического элюирования с тонкослойных пластинок (с разрешения фирмы CAMAG).

2,5 мм, а максимальный диаметр пятен не должен превышать 20 мм.

Прямое количественное обнаружение на хроматограмме можно проводить, измеряя площадь пятна или определяя интенсивность его окраски, но такое определение сопряжено со значительными экспериментальными погрешностями и поэтому пригодно только для ориентировочных измерений. Более точные методы определения содержания соединений непосредственно в слое требуют применения специальных приборов. Все методы этой группы основаны на принципах фотометрии, причем чаще всего применяют денситометрию, затем спектрофотометрию, флуориметрию и авторадиографию. Тем читателям, которых интересуют указанные методы обнаружения, следует обратиться к отличной обзорной статье Йорка и Крауса [24] или монографии Тачстона [67].

9.7. ПРЕПАРАТИВНАЯ ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

В большинстве случаев разделение, достигаемое посредством аналитической ТСХ, можно перевести на микро- или полумикропрепаративный уровень. Препаративное разделение на тонких слоях чаще всего проводят методами адсорбционной и распределительной хроматографии, тогда как препаративное разделение методом ионообменной или колоночной хроматографии проводится только на колонках. Помимо препаративной ТСХ существуют и другие методы препаративного разделения (например, классическая жидкостная хроматография и особенно высокоэффективная жидкостная хроматография, или хроматография при высоком давлении, см. гл. 4), которые в ряде случаев могут оказаться более эффективными. Методом сухой колоночной хроматографии (СКХ) можно проводить препаративное разделение в таких же условиях, которые применяются при разделении методом ТСХ [36]. Поэтому рекомендуется прежде всего проанализировать достоинства и недостатки различных типов и методов хроматографии и оценить целесообразность их применения для разделения конкретных соединений (устойчивых или неустойчивых, с близкими или значительно различающимися величинами R_f). Выбор метода зависит также от того, какие количества соединений и как быстро необходимо получить.

В препаративной ТСХ используются те же адсорбенты, что и в аналитической ТСХ. Однако некоторые фирмы выпускают адсорбенты, предназначенные специально для препаративной хроматографии (например, фирма E. Merck, Дармштадт, ФРГ). Оптимальная толщина слоев, применяемых в препаративной

ТСХ, составляет от 0,5 до 1 мм. Обычный размер пластинок 20×20 см, иногда 20×40 или даже 20×100 см. Условия успешного препаративного разделения на тонкослойных пластинках: однородность слоя, правильное (т. е. очень равномерное) нанесение пробы на стартовую линию, полное насыщение атмосферы хроматографической камеры.

9.7.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ СЛОЕВ

Слои для препаративной ТСХ готовят с помощью специальных устройств, иногда называемых аппликаторами, желательно с регулируемой шириной щели (рис. 9.13). Количество нанесенного адсорбента может быть самым разным. Для ТСХ на

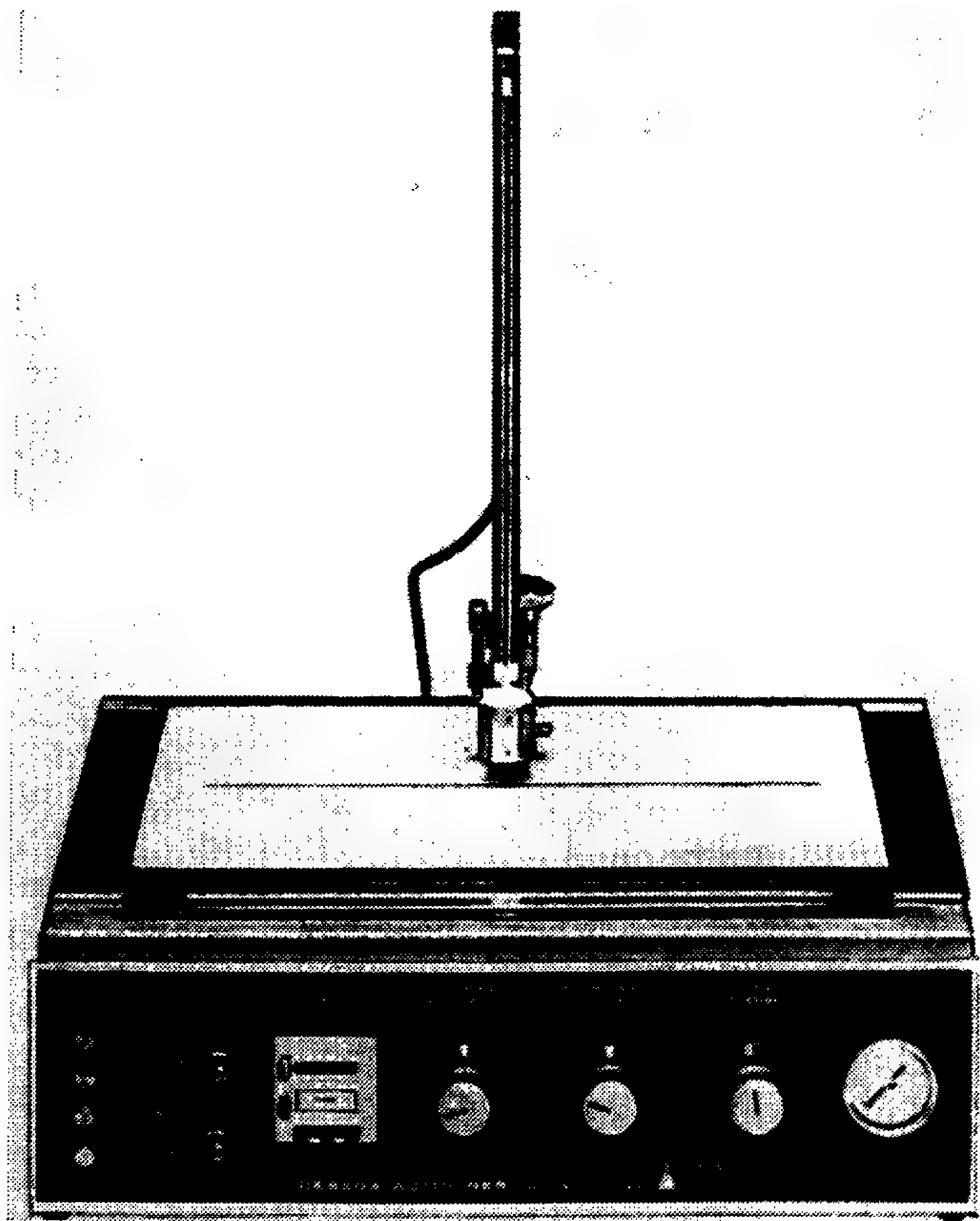


Рис. 9.13. Прибор для автоматического нанесения проб на слои (с разрешения фирмы Desaga).

силикагеле на пластинку размером 20×20 см наносят 20—25 г адсорбента, толщина слоя составляет 1 мм. Продаются также готовые пластинки для препаративной ТСХ, например изготовляемые фирмой Merck пластинки фертигплаттен.

9.7.2. НАНЕСЕНИЕ ПРОБ

Растворы проб (концентрация 5—20%) лучше всего наносить на стартовую линию с помощью автоматического аппликатора, так как в этом случае проба будет нанесена совершенно равномерно вдоль всей стартовой линии. В этих целях очень удобно пользоваться прибором Desaga Autoliner, выпускаемым фирмой Desaga (рис. 9.13). Если же в лаборатории не имеется такого прибора, то пробу наносят на пластинки следующим образом. Маленький тампон из хлопковой ваты вводят с помощью тонкой проволоки на 4—5 мм внутрь кончика пипетки емкостью 1 мл. Высовывающемуся кончику ватного тампона придают такую форму, чтобы образовалась маленькая кисточка. Далее в пипетку засасывают раствор на такую высоту, чтобы жидкость не могла сама по себе свободно вытекать из нее, и после этого легкими равномерными движениями наносят раствор вдоль отмеченной стартовой линии (при этом можно пользоваться шаблоном). Приобретя небольшой опыт или потренировавшись на старых пластинках, можно добиться значительно лучшего качества нанесения проб, чем при нанесении их в виде отдельных пятен.

9.7.3. ЭЛЮИРОВАНИЕ ХРОМАТОГРАММ

Элюирование следует проводить в хорошо закрытых хроматографических камерах соответствующего размера, лучше всего в термостатируемой комнате. Разделение соединений с близкими R_f следует проводить в специальных камерах, например S-камере, выпускаемой фирмой Desaga (рис. 9.5).

9.7.4. ОБНАРУЖЕНИЕ

В препаративной ТСХ используют такие методы обнаружения, которые не нарушают целостности слоев. Почти универсальным является метод обнаружения на флуоресцирующих слоях посредством УФ-облучения (при длине волны 254 и(или) 366 нм). На пластинках с такими слоями можно обнаружить соединения, не только поглощающие УФ-излучение, но и гасящие флуоресценцию; последние обнаруживаются как темные пятна на флуоресцирующем фоне.

Способ обнаружения флуоресцирующих соединений на простых слоях очевиден.

9.7.5. ВЫДЕЛЕНИЕ СОЕДИНЕНИЙ

По окончании обнаружения ту часть слоя сорбента, где обнаружено данное соединение, соскабливают и переносят в маленькую колонку с помощью какого-либо устройства, обычно вакуумного микроаспиратора. Далее выделяют это соединение, элюируя его более полярным растворителем или смесью растворителей. Чистоту полученного соединения проверяют методом ТСХ, используя исходную аналитическую систему.

9.7.6. ПРЕИМУЩЕСТВА ПРЕПАРАТИВНОЙ ТСХ

Основное преимущество препаративной ТСХ — простота выполнения — особенно заметно проявляется при разделении соединений со значительно различающимися величинами R_f. При разделении смесей соединений с очень близкими значениями R_f многое зависит, как уже говорилось выше, от качества нанесения проб. Следует также учитывать, что скорость перемещения разделяемых соединений по тонкому слою неодинакова, что он изменяется в зависимости от скорости испарения растворителя. На поверхности слоя соединение перемещается быстрее, чем вблизи подложки. Это различие можно в какой-то степени уменьшить, проводя хроматографирование в камере с полностью насыщенной атмосферой, но тем не менее именно оно может быть причиной неудачного разделения.

9.7.7. СУХАЯ КОЛОНОЧНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Сухая колоночная хроматография (СКХ) [36] фактически представляет собой усовершенствованный вариант метода, использованного Цветом. Эти два метода взаимосвязаны. Условия разделения методом СКХ подбирают, проводя хроматографирование на тонких слоях. Главное преимущество СКХ заключается в том, что этим способом можно разделять значительно большие количества веществ (несколько граммов) при меньшей длительности разделения и меньшем расходе растворителей. Основное условие, обеспечивающее получение хороших результатов посредством СКХ, — правильный подбор активности адсорбента. Оксид алюминия и силикагель дезактивируют, добавляя соответственно 3—6 и 12—15% воды (см. гл. 4, разд. 4.2).

ЗАПОЛНЕНИЕ КОЛОНОК

Сухой надлежащим образом дезактивированный адсорбент (оксид алюминия или силикагель*) помещают в пластмассовую трубку. В такую колонку вводят смесь, которую надо раз-

* Адсорбенты и пластмассовые трубки для СКХ выпускает ряд фирм, например фирмы Waters Associates Inc., Milford, Mass. 01757, USA и M. Woelm, D-344 Eschwege, BRD.

делить, и начинают элюирование заранее подобранным растворителем или системой растворителей. Когда растворитель достигнет конца колонки, элюирование прекращают. Отдельные компоненты разделенной смеси образуют соответствующим образом окрашенные зоны, если же разделяемые соединения бесцветны, в адсорбенты вводят УФ-индикаторы и обнаруживают соединения с помощью УФ-облучения. Положение разделенных компонентов можно также определять с помощью полученной в таких же условиях аналитической тонкослойной хроматограммы; положение зон соединений в этих двух случаях должно быть аналогичным. После того как определено положение отдельных соединений в колонке, ее разрезают на зоны и экстрагируют выделенные соединения обычным способом или в экстракторе Сокслета.

9.7.8. ПЕРЕНОС УСЛОВИЙ ТСХ НА КОЛОНОЧНУЮ ХРОМАТОГРАФИЮ

Перенос условий ТСХ на колоночную хроматографию (КХ) сопряжен с рядом трудностей, и поэтому желательно знать, какие факторы влияют на этот перенос. Согласно данным Гейсса [16], неудачи могут быть вызваны следующими причинами: а) переходом от ТСХ к КХ при использовании несопоставимых хроматографических систем, например BN-камеры и сухой колонки; б) неправильными формулами перехода; в) применением в ТСХ и КХ различных сорбентов; г) различной активностью сорбентов, используемых в ТСХ и КХ; д) отсутствием оптимизации режима работы при КХ; е) перегрузкой колонки.

Если используется однокомпонентный элюент, сухая колоночная хроматография соответствует ТСХ в S-камере с ненасыщенной атмосферой (это справедливо также и для многокомпонентных систем), а смеси растворителей расслаиваются одинаково как в S-камере с ненасыщенной атмосферой, так и в сухой колонке, образуя несколько фронтов растворителей. Однокомпонентный элюент, естественно, не может расслоиться, и значения R_f, полученные в ТСХ, соответствуют величинам R_f, получаемым при хроматографировании как в сухой, так и в увлажненной колонках.

В отношении многокомпонентных систем можно сказать следующее: а) результаты, полученные в S-камере и в сухой колонке, практически аналогичны (в колонке немного раньше появляется β-фронт); б) результаты, полученные в S-камере, ни в какой мере не соответствуют результатам, получаемым в смоченной колонке; в) двойником хроматографии в увлажненной колонке является ТСХ с проточным элюированием и приближенным двойником (после умножения значений R_f на ко-

эффициент, составляющий около 1,5) — ТСХ в N-камере; г) разделение в N-камере ни в какой мере не соответствует разделению в сухой колонке.

Изложенные принципы поясняет табл. 9.8.

Таблица 9.8

Переход от условий ТСХ к условиям колоночной хроматографии[a] [16]

	Однокомпонентные элюенты		Многокомпонентные элюенты	
Переход возможен	*S*-камера (N-камера)·*f*	Сухая или увлажненная колонка	S-камера	→ сухая колонка
			(N-камера)·*f*	→ увлажненная колонка
			Проточное элюирование	→ сухая колонка
Переход невозможен			S-камера	→ увлажненная колонка
			N-камера	→ сухая колонка

[a] *f* — множитель, равный примерно 1,5.

Важным условием перехода от ТСХ к КХ является применение того же самого сорбента. Сорбенты могут отличаться только размерами частиц. В настоящее время выпускается лишь считанное число готовых сорбентов, одновременно пригодных как для ТСХ, так и для КХ. Это, например, оксид алюминия Т и кизельгель-60, выпускаемые фирмой Merck. Другие сорбенты чаще всего содержат связующее, которое влияет на избирательность разделения.

Активность тонких слоев, применяемых для исследовательских работ по ТСХ, должна быть такой же, как и у неподвижной фазы, используемой в КХ. По этой причине лучше всего выдерживать материал, предназначенный для заполнения колонок, несколько часов на воздухе вместе с пластинками для ТСХ. В результате мы можем быть уверены, что активность этих сорбентов одинакова, хотя она не всегда будет оптимальной. Для определения оптимальной активности лучше всего использовать варио-KS-камеру.

Допустимую загрузку колонки, согласно Снайдеру [59], определяют следующим образом: если допустимая нагрузка на тонкий слой равна x граммов на одно пятно, то в колонку можно соответственно загрузить $x/(100\,R_f)$ граммов пробы в расчете на грамм сорбента. Например: $x=100$ мкг; $R_f=0{,}5$; максимальная загрузка колонки составляет $10^{-4}/(100\times0{,}5)=2$ мкг/г.

9.8. ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ ТСХ

9.8.1. РАЗДЕЛЕНИЕ ОЛЕФИНОВ НА СИЛИКАГЕЛЕ, ПРОПИТАННОМ СОЛЯМИ СЕРЕБРА

Прасад и др. [49] изучали разделение сескви- и дитерпеновых углеводородов на слоях силикагеля, пропитанных нитратом или перхлоратом серебра. Одновременно они исследовали влияние гипса на характер разделения. Полученные ими результаты суммированы в табл. 9.9. Пропитанный солями серебра силикагель приготавливали в затемненном помещении. Растворяли нитрат или перхлорат серебра (15 г) в воде (23 мл) и медленно при перемешивании разбавляли раствор ацетоном (250 мл.) Далее, также при перемешивании, добавляли силикагель (100 г) или силикагель с гипсом. После введения силикагеля смесь перемешивали еще 15 мин. Затем на водяной бане отгоняли растворители при пониженном давлении (водоструйный насос). Рыхлый, свободно пересыпающийся порошок

Таблица 9.9

Величины R_f различных терпеновых олефинов, полученные на слоях силикагеля, содержащих ионы серебра (и в некоторых случаях добавки гипса) [49]

Соединение[а]	Число двойных связей	Жидкая фаза[б]	R_f, полученные на слоях			
			с нитратом серебра		с перхлоратом серебра	
			с гипсом	без гипса	с гипсом	без гипса
Лонгициклен	0	А	0,75	0,68	0,77	0,73
Изолонгифолен	1	"	0,66	0,58	0,67	0,66
Лонгифолен	1	"	0,44	0,31	0,32	0,14
α-Гурюнен	1	Б	0,82	0,80	0,79	0,78
α-Бергамотен	2	"	0,74	0,62	0,71	0,61
β-Бизаболен	3	"	0,37	0,18	0,32	0,16
α-Гимахален	2	В	0,69	0,56	0,70	0,55
β-Гимахален	2	"	0,61	0,46	0,62	0,46
Цембрен	4	Г	0,85	0,81	0,86	0,83
Цембрен А	4	"	0,65	0,41	0,42	0,16
Х-Дитерпен	?	"	0,77	0,63	0,76	0,61

[а] Цембрен, цембрен А и Х-дитерпен — дитерпеновые углеводороды ($C_{20}H_{34}$), остальные соединения — сесквитерпеновые углеводороды ($C_{15}H_{24}$).

[б] Жидкая фаза: А — петролейный эфир, Б — 50% бензола в петролейном эфире, В — 20% бензола в петролейном эфире, Г — 15% этилацетата в бензоле. Температура (25±1)°С, длина пути фронта растворителя 10 см.

хранили в темных склянках. Суспензию для нанесения слоя получали, добавляя 2—2,5 части воды на одну часть сорбента, и тщательно перемешивали эту смесь в ступке. Толщина слоя составляла 0,5 мм. Пластинки сушили на воздухе около 4 ч, при необходимости активировали 2,5 ч при 105 °С и охлаждали 10—15 мин в эксикаторе.

9.8.2. РАЗДЕЛЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ТРИГЛИЦЕРИДОВ ПАЛЬМОВОГО МАСЛА

Природные смеси триглицеридов — это сложные смеси очень близких по физическим и химическим свойствам компонентов, которые можно разделять, комбинируя ТСХ с применением солей серебра и обращенно-фазную ТСХ. При помощи первого метода проводится предварительное фракционирование по числу и характеру двойных связей, а второй метод (обращенно-фазная ТСХ) позволяет разделить соединения в соответствии с числом углеродных атомов в молекуле. Как правило, рекомендуется проводить предварительную очистку пробы в колонке с силикагелем, применяя бензол в качестве элюента. Разделение триглицеридов пальмового масла проводят следующим образом [73]. Сначала разделяют пробу (8 г) на слоях силикагеля G (толщина 0,6 мм, размер пластинок 10×40 см), пропитанных 10%-ным раствором нитрата серебра, элюируя их смесью хлороформ+1% метанола. По окончании разделения пластинки опрыскивают водным раствором 2,7-дихлорфлуоресцеина и облучают УФ-лампой (длина волны 360 нм). Затем соскабливают соответствующие зоны с девяти пластинок и помещают полученный материал в хроматографическую колонку (диаметр около 12 мм) с двухсантиметровым слоем активированного силикагеля (фирмы Merck, размер частиц 0,05—0,2 мм, активация при 150 °С в течение 6 ч), чтобы удалить из смеси следы обнаруживающего красителя. Элюирование проводят 100 мл не содержащего пероксидов безводного эфира (приготовленного посредством фильтрации через щелочной оксид алюминия с активностью I). Количественное определение осуществляют колориметрически с использованием хромотроповой кислоты.

Полученные отдельные группы триглицеридов наносят на слои кизельгура (1,3 мг на пластинку фирмы Merck размером 20×20 см, толщина слоя 0,25 мм), пропитанные парафиновым маслом в качестве неподвижной фазы. Перед пропиткой слои очищают, элюируя их чистым эфиром. Слои пропитывают, погружая пластинки в 7,5%-ный раствор парафинового масла в петролейном эфире (35—45 °С). Элюирующая система: смесь ацетон — ацетонитрил 8 : 2 или 7 : 3 соответственно для триглицеридов с короткой углеродной цепью или сильно ненасыщен-

ных жирных кислот. Элюент насыщают на 80% парафиновым маслом. После элюирования слои сушат час на воздухе, а затем в токе азота до полного удаления подвижной фазы. После этого тщательно опрыскивают пластинки 0,01%-ным водным раствором флуоресцеина и осматривают их, облучая УФ-лампой (360 нм).

Соответствующие зоны соскабливают с пластинок и элюируют, как описано выше. Далее испаряют 5—10 мл элюента в токе азота, добавляя к остатку 0,5 мл 0,4%-ного спиртового раствора гидроксида натрия, и омыляют пробу при 70 °С в течение 80 мин. После этого добавляют точно 1 мл 1%-ной серной кислоты. Чтобы извлечь парафиновое масло, добавляют 2,5 мл эфира, не содержащего перекисей, смесь встряхивают и возможно более полно отделяют эфирную фазу. Из водной фазы отбирают 1 мл жидкости, помещают ее в чистую пробирку и нагревают 15 мин в бане с кипящей водой. После чего добавляют в пробирку 0,05 мл 5%-ного раствора периодата натрия, выдерживают 20 мин и восстанавливают избыточный периодат, добавляя 0,05 мл 5%-ного раствора бисульфита натрия. Еще через 10—20 мин добавляют точно 5 мл раствора хромотроповой кислоты (0,2% натриевой соли в 60%-ной серной кислоте), перемешивают и нагревают 80 мин при 105 °С. После охлаждения проводят колориметрическое определение в одно- или полусантиметровых кюветах при длине волны 570 нм. В качестве холостой пробы используют элюат, полученный подобным образом со слоя, не содержащего триглицеридов.

Хроматография на слоях, содержащих соли серебра, и анализ триглицеридов рассматриваются, в частности, Литчфилдом [33], а обзор методов денситометрического анализа опубликован Приветтом и др. [50].

9.8.3. ОДНОМЕРНОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ СМЕСИ ШЕСТНАДЦАТИ АМИНОКИСЛОТ НА ПЛЕНКАХ С ИОНООБМЕННЫМ СЛОЕМ

Используя пленки с ионообменным слоем (см. табл. 9.5), Девении и др. [10] успешно разделили смесь 16 аминокислот; описанный этими авторами метод можно также использовать, например, для быстрого анализа гидролизатов пептидов. Пленку в течение 3 ч приводят в равновесие с цитратным буферным раствором (0,004 н. раствор соли натрия, pH 3,2) и потом сушат при комнатной температуре. Стандартным раствором служит 0,1%-ный раствор смеси аминокислот (аргинин, лизин, гистидин, фенилаланин, тирозин, лейцин, изолейцин, метионин, валин, пролин, аланин, глицин, глутамовая кислота, треонин, серин и аспарагиновая кислота) в 0,01 н. соляной кислоте, ко-

торый наносили в количестве 2—10 мкл в виде узкой полоски справа и слева от исследуемого гидролизата. После примерно 10-минутного просушивания пленку помещали в хроматографическую камеру с цитратным буферным раствором (84 г моногидрата лимонной кислоты, 16 г гидроксида натрия, 5,9 мл соляной кислоты с уд. массой 1,19 и дистиллированная вода до общего объема 1000 мл, pH раствора 3,3). Элюирование проводили при 50 °C. Примерно через 2 ч, когда фронт растворителя достигал верхнего края пленки, ее вынимали, сушили 9 мин при 105 °C, тщательно опрыскивали нингидриновым реагентом (0,2 г нингидрина в 95 мл метанола +5 мл 2,4,6-коллидина) и нагревали 10 мин при 105 °C. Пятна можно также стабилизовать, опрыскивая их раствором 1 г ацетата кадмия в 50 мл ледяной уксусной кислоты, разбавленной 100 мл дистиллированной воды; после такого опрыскивания пленку нагревают 5 мин при 105 °C.

9.8.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИЕЙ

Метод гель-хроматографии, включая определение молекулярных масс в тонком слое, описал Радолой [54]. Суспензию геля приготавливают, перемешивая 4 г сефадекса G-200 с 100 мл 0,5 М раствора хлорида натрия, содержащего 0,02 М фосфатный буфер (KH_2PO_4—Na_2HPO_4) с pH 7,2—7,4. В таком же количестве раствора размешивают 8 г сефадекса G-75, 4 г сефадекса G-100, 4 г биогеля P60 и 3,5 г биогеля P300. Чтобы гель набух, его выдерживают 2—3 сут при 4 °C, после чего непродолжительное время вакуумируют, используя водоструйный насос. С помощью устройства для нанесения сорбента фирмы Desaga (системы Шталя) наносят слои толщиной 0,5 мм; если жидкой фазы было взято больше, как в данном случае, то поверхность слоя остается гладкой. Слои сушат на воздухе 5—15 мин и помещают в камеру с увлажненной атмосферой, где их можно хранить до 2 недель. Непосредственно перед употреблением пластинки обрабатывают соответствующим буферным раствором, лучше всего в течение ночи.

Подготовленные пластинки вынимают из камеры и кладут горизонтально. Раствор пробы белков наносят на угол покровного стекла микроскопа (18×18 мм) и подносят этот угол к поверхности слоя. Раствор впитывается за несколько секунд. Слоя должен касаться весь смоченный угол, иначе образуется капля и на стартовой линии получится неровная полоса. На пластинку наносят 10—20 мкл 0,2—2%-ного белка. Таким способом можно нанести на пластинку размером 20×20 см пять или шесть проб; расстояние между местами нанесения от-

дельных проб составляет 2—2,5 см, а стартовая линия удалена на 3 см от верхнего края пластинки. Скорость элюирования зависит от наклона пластинки и высоты уровня растворителя в резервуаре. При хроматографировании на сефадексе G-200 угол

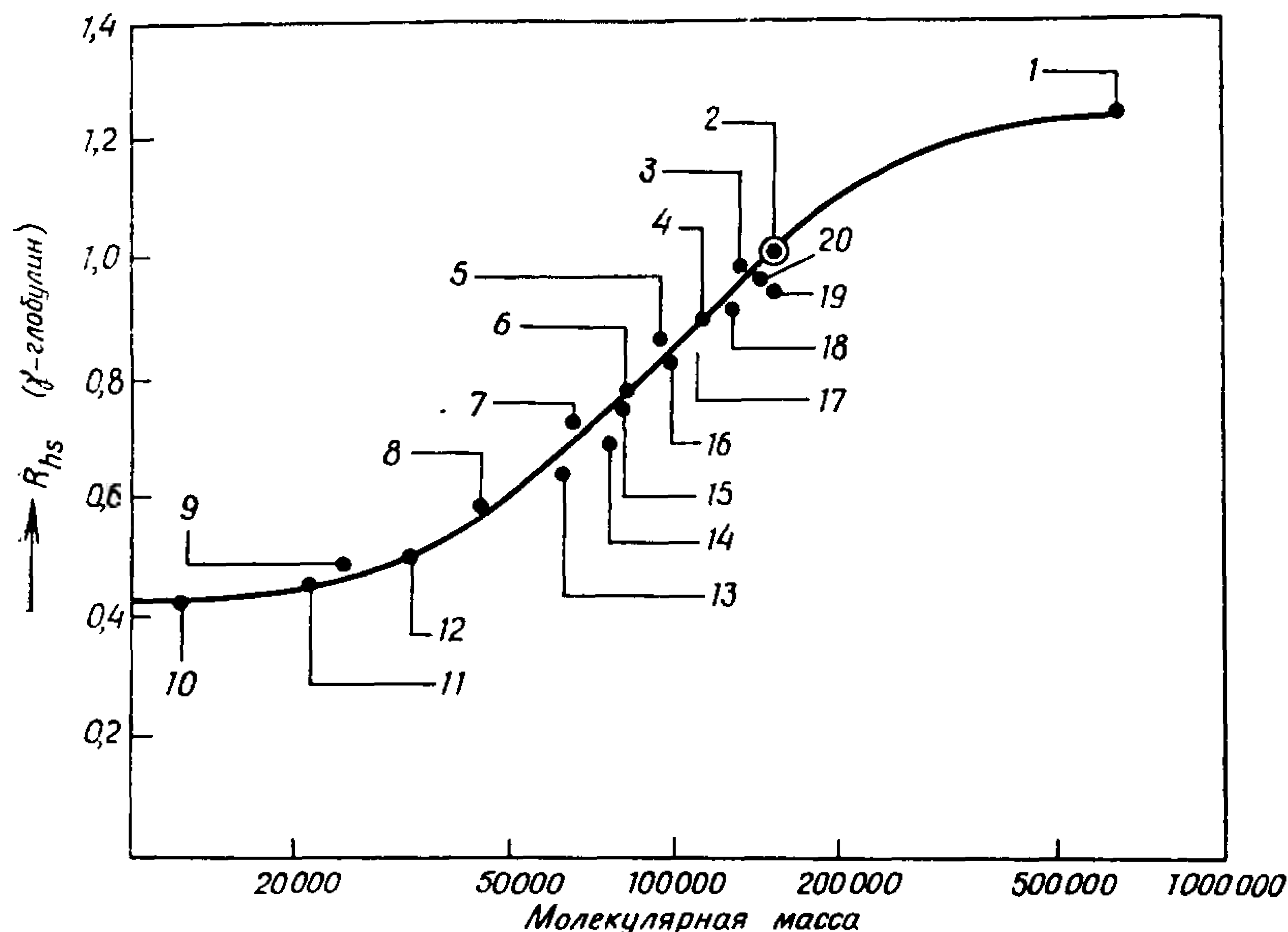


Рис. 9.14. Определение молекулярных масс аспарагиназы методом гель-хроматографии на тонких слоях сефадекса G-200 [4]. Величина пути перемещения анализируемых соединений отнесена к величине пути перемещения γ-глобулина, полученного из сыворотки крови человека. Разделение проведено по методу Радолы [54] (см. текст) с применением буферного раствора 0,05М трис(оксиметил)аминоэтан — HCl (pH 7,5), 0,2М раствора KCl и 0,001М раствора EDTA.

1 — тироглобулин; *2* — γ-глобулин (из сыворотки крови человека или крупного рогатого скота); *3* — альбумин из сыворотки крупного рогатого скота (димер); *4* — лактат дегидрогеназы (из сердца свиньи); *5* — гексокиназа (из дрожжей); *6* — спиртовая дегидрогеназа (из печени лошади); *7* — альбумин из сыворотки крови крупного рогатого скота; *8* — овальбумин; *9* — химотрипсиноген; *10* — цитохром *с*; *11* — трипсиновый ингибитор (из бобов сои); *12* — карбоксипептидаза А; *13* — фосфоглицеромутаза; *14* — глицеролфосфатдегидрогеназа; *15* — креатинкиназа; *16* — глицерол-6Р-дегидрогеназа (из дрожжей); *17* — аспарагиназа; *18* — алкогольдегидрогеназа; *19* — альдолаза; *20* — глюкозоксидаза.

наклона равен 10° и элюирование длится 4—7 ч; для других марок геля оптимальный угол наклона следует определять эмпирически. По окончании элюирования пластинку вынимают из камеры и снимают с нее полоски фильтровальной бумаги. Положение зон определяют контактным методом, т. е. накладывают на слой лист ватмана № 3 размером 20×17 см и оставляют его на слое на 30—60 с, а затем сушат этот лист 15 мин в сушильном шкафу при 110 °С. Окрашивают зоны насыщенным раствором красителя Amido Black 10B (фирмы Merck) в

смеси метанола и уксусной кислоты (9 : 1 по объему) или 0,25%-ным раствором Coomassie Brilliant Blue R250 (фирмы Serva) в таком же растворителе; этими реагентами воздействуют на слои в течение 5—10 мин. В первом случае обесцвечивание проводят смесью из двух частей смеси метанол — уксусная кислота (9 : 1) и одной части воды. После первых двух промывок растворитель выбрасывают; растворители, которыми проводили третью и последующие промывки, собирают, обесцвечивают древесным углем и используют повторно. Во втором случае бумагу промывают последовательно водопроводной водой, смесью метанол — уксусная кислота — вода (50 : 10 : 50 по объему); растворители после третьей и последующих промывок собирают, обесцвечивают древесным углем и используют повторно.

При определении молекулярной массы неизвестного соединения (по методу, пригодному для определения молекулярной массы белков) лучше всего тщательно измерить расстояние от центра пятна этого соединения до стартовой линии и от центра пятна известного соединения, используемого как стандарт, до стартовой линии. Результат измерений выражают величиной R_M*, определяемой как соотношение длины пути исследуемого соединения (d_i) и стандарта (d_s), т. е. $R_M = d_i/d_s$. Далее молекулярную массу определяют по кривой зависимости величин R_M, рассчитанных по этой формуле, от молекулярной массы.

Описанным способом определены, в частности, молекулярные массы аспарагиназы, выделенной из Escherichia coli (рис. 9.14) [4]. На сефадексе G-200 подобные определения можно проводить с погрешностью ±10%. Верхняя граница линейного участка зависимости R_M — молекулярная масса при хроматографировании на сефадексе G-200 составляет $2{,}4 \cdot 10^5$.

По мнению авторов работы [2], лучше использовать кривую зависимости обратной величины длины пути ($1/d$) от логарифма молекулярной массы, так как при этом можно сравнивать результаты определения, проведенного методами колоночной и тонкослойной хроматографии.

9.8.5. РАЗДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ ТИПА ТЕТРАЦИКЛИНА

Лангнер и Тейфель [30] разделили 10 очень близких по структуре тетрациклиновых антибиотиков на выпускаемых фирмой Merck пластинках со слоями целлюлозы. Эти пластинки пропитывали, опрыскивая их 5%-ным раствором EDTA, величину pH которого регулировали, добавляя от 9 до 20% раствора гидроксида натрия. Элюирование проводили около 120 мин

* Не следует смешивать с величиной R_M, введенной Бейт-Смитом и Уэстоллом (гл. 3, разд. 3.1.4).

в S-камере с насыщенной атмосферой насыщенным водой *н*-бутанолом. По окончании разделения пластинки или сразу облучали УФ-лампой (254 и 366 нм) или сначала выдерживали 5 мин в парах аммиака, а затем рассматривали их при УФ-облучении. Полученные величины R_f лежат в пределах от 0,05 до 0,40. Среди исследованных соединений, включая стандартные пробы, только окситетрациклин, по-видимому, не содержал примесей других соединений.

Химические свойства антибиотиков могут быть самыми различными, поэтому условия разделения их методом ТСХ также могут значительно различаться. Этой области хроматографии посвящен, в частности, обзор [8]. В качестве иллюстрации в табл. 9.10 приведены данные о некоторых режимах разделения.

Таблица 9.10

Условия разделения некоторых антибиотиков

Антибиотики	Состав слоя	Элюирующая система	Примечания	Литература
Биосинтетические и полусинтетические пенициллины	Силикагель G	Изоамилацетат — метанол — уксусная кислота — вода (65 : 20 : 5 : : 10)		39
Макролиды	Силикагель G и кизельгур G (1 : 1)	Дихлорометан — *н*-гексан — этанол (60 : 35 : 5)	Пропитка формамидом	5
Полиеновые макролиды	Силикагель HF_{254} с буферной добавкой	Дихлорметан — метанол (85 : 5)	Буферный раствор: 0,2 М KH_2PO_4, 0,2 М Na_2HPO_4	7
Хлорамфеникол	Полиамид	*н*-Бутанол — хлороформ — уксусная кислота (10 : : 90 : 0,5)		34
Стероидные антибиотики	Силикагель	Этилацетат	Также этилацетат, насыщенный водой	12

9.8.6. РАЗДЕЛЕНИЕ ГЕСТАГЕНОВ

В статье [53] указаны условия разделения 16 гестагенов (стероидных гормонов, способствующих нормальному протеканию беременности) на пластинках с силуфолом UV_{254} (табл. 9.11). На пластинки размером 20×20 см наносят 5—10 мкл 0,1%-ного раствора пробы в смеси хлороформ — метанол (1 : 1) и элюируют снизу вверх смесью хлороформ — метилэтилкетон (37 : 3) в камере с насыщенной атмосферой. Обнаруживают разделенные соединения или при УФ-облучении, или

при равномерном опрыскивании пластинки смесью насыщенного раствора трихлорида сурьмы в хлороформе и уксусного ангидрида (8:2). После опрыскивания хроматограммы помещают в вертикальном положении в сушильный шкаф, выдерживают минуту при температуре 100 °С и рассматривают их при УФ-облучении (366 нм). Далее опять нагревают 3 мин при 100 °С и рассматривают на свету (табл. 9.11).

Таблица 9.11

Разделение гестагенов [53]

Гестаген	hR_f	254 нм	Окраска, вызываемая $SbCl_3$	
			в видимом свете	при УФ-облучении (360 нм)
11-Оксипрогестерон	7	+	—	—
Норэтистерон	24	+	Фиолетовая	Фиолетовая
Этистерон	28	+	»	Ярко-красная
Прегненолон	31	—	»	Фиолетовая
Суперлутин	38	+	»	Красная
Ацетат прегненолона	40	—	»	Фиолетовая
Дегидропрогестерон	43	+	Сине-зеленая	Сине-зеленая
Прогестерон	46	+	Синяя	—
Хлормадинон	53	+	Сине-зеленая	Синяя
Ацетат прогестерона	57	+	Синяя	—
Хлорсуперлутин	60	+	Фиолетово-коричневая	Красно-фиолетовая
Бромсуперлутин	66	+	»	Коричневая
Капроат суперлутина	70	+	Фиолетовая	Красная
Неолутин	73	+	Сине-зеленая	—
Капроат 16-дегидропрегненолона	92	+	Красно-фиолетовая	Фиолетово-коричневая
Капроат 6-метил-16-дегидропрегненолона	94	+	Сине-фиолетовая	Фиолетовая

Результаты разделения стероидов различных видов приведены, например, в статье Лисбоа [35].

9.8.7. РАЗДЕЛЕНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКИХ АНИОНОВ НА СЛОЯХ ОКСИДА АЛЮМИНИЯ

Ледерер и Полкаро [31] использовали для разделения неорганических анионов готовые слои оксида алюминия MN-полиграм-алокс *N* (см. табл. 9.3) размером 4×13 см. В качестве

элюентов они применяли водные растворы сульфата калия (0,1—1,0 н.), фосфата калия (0,05—1,0 н.), фторида натрия (0,1—1,0 н.) и карбоната натрия (0,1—1 *M*). Величины R_f некоторых анионов, полученные при элюировании раствором карбоната натрия, показаны на рис. 9.15.

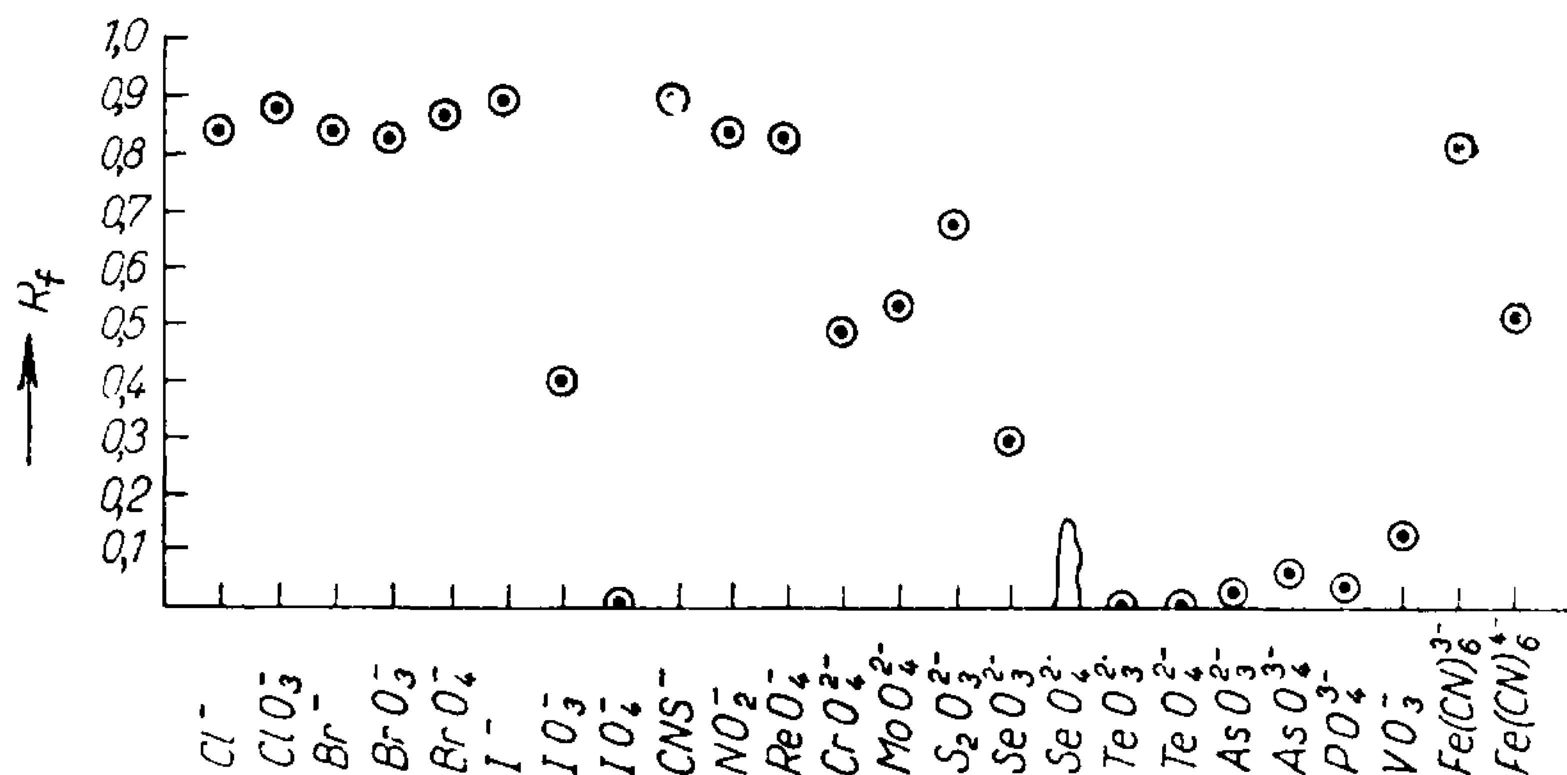


Рис. 9.15. Схематическое представление значений R_f неорганических анионов, полученных на слоях оксида алюминия при элюировании 0,1 н. раствором карбоната натрия [31].

9.8.8. НЕРАЗРУШАЮЩЕЕ ВИЗУАЛЬНОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ ИЗОПРЕНОИДНЫХ ХИНОНОВ ПОСЛЕ РАЗДЕЛЕНИЯ МЕТОДОМ ОБРАЩЕННО-ФАЗНОЙ ТСХ

Рокос [55] описал применение пропитанных пластинок в обращенно-фазной ТСХ с одновременным введением обнаруживающего красителя в элюирующий растворитель. Этот метод особенно эффективен, если сорбентом служит кизельгур G и если элюирующий растворитель достаточно полярен, как, например, смесь ацетон — вода (39 : 1). На пластинки размером 20×20×0,025 см наносят слой кизельгура G (фирмы Merck) в виде суспензии, к которой предварительно добавляют в соотношении от 0,5 : 1 до 0,55 : 1 0,003%-ный (масса/объем) водный раствор родамина 6G или 0,05%-ный (масса/объем) водный раствор флуоресцеината натрия. После нанесения слоя пластинки сушат 15 мин в горизонтальном положении на воздухе, а затем 30 мин при 100 °С. Раствор 25 г медицинского парафинового масла в 250 мл петролейного эфира (40—60 °С) пропускают через колонку с оксидом алюминия (фирма Woelm, 25 г, активность 0) и затем, добавляя петролейный эфир, доводят объем фильтрата до 500 мл. Пропитку пластинок проводят посредством восходящего элюирования: осторожно погружают край пластинки в полученный раствор и держат ее так, пока

весь слой не будет выглядеть однородным. Пропитанные пластинки сушат на воздухе. Хроматограммы элюируют водным ацетоном, насыщенным медицинским парафиновым маслом и содержащим тот же краситель, что и пропитывающий раствор (0,003% родамина 6G или 0,4% флуоресцеината натрия). При более высоких концентрациях красителя чувствительность понижается. Обнаружение проводят посредством УФ-облучения с длиной волны 360 нм.

9.8.9. РАЗДЕЛЕНИЕ МОНО- И ОЛИГОСАХАРИДОВ НА ТОНКИХ СЛОЯХ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Разделяя фрагменты полисахаридов, подвергнутых ферментативному расщеплению на пластинках с целлюлозой (порошок целлюлозы MN300, производства фирмы Macherey, Nagel und Co., Düren), Спичан [60] получил очень хорошие результаты. Приготовленные обычным способом пластинки (20×20×0,025 см) сушат сначала на воздухе, а затем 10 мин в сушильном шкафу при 105 °С, после чего их помещают в эксикатор над хлоридом кальция. Хроматографирование ведут восходящим способом в N-камере, используя систему уксусная кислота — этилацетат — пиридин — вода (1 : 7 : 5 : 3); этот раствор в свежеприготовленном виде помещают в камеру и выдерживают в ней перед хроматографированием в течение часа. Продолжительность хроматографирования при длине пути элюирования 19 см составляет 2 ч. По окончании разделения пластинки сушат 15 мин при 60 °С и обнаруживают щелочным раствором нитрата серебра (восстанавливающие сахара) и реагентом, смесью бифталата анилина, нафторезорцина и трихлоруксусной кислоты (восстанавливающие и невосстанавливающие сахара). Таким способом было достигнуто хорошее разделение следующих смесей сахаров: смеси D-(+)-галактозы, D-(—)-фруктозы, α-D-глюкозы, D-(+)-мальтозы, мальтотриозы и мальтопентозы (обнаружение первым реагентом); смеси D-(—)-фруктозы, α-D-глюкозы, сахарозы, D-(+)-галактозы и D(+)-лактозы (обнаружение вторым реагентом).

9.8.10. РАЗДЕЛЕНИЕ ПЕНИЦИЛЛИНОВ С ОЧЕНЬ БЛИЗКИМИ СТРУКТУРАМИ МЕТОДОМ РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНОЙ ТСХ

Пан [45] разработал способ разделения природных или полусинтетических пенициллинов очень близкой структуры с помощью распределительной хроматографии на бумаге или на тонких слоях целлюлозы. Разделение проводится на ватмане № 1 и готовых пластинках MN300 (5×20×0,025 см). В качестве неподвижных фаз используют буферные растворы с pH 4,1

Таблица 9.12

Разделение очень близких по структуре пенициллинов на бумаге и тонких слоях целлюлозы [45]

Подвижная фаза[а]	Неподвижная фаза, pH буферного раствора	Пятно А	Пятно Б	R_f[б]		Расстояние от пятна до стартовой линии, см	
				А	Б	А	Б
н-Бутиловый спирт — *трет*-амиловый спирт (6 : 1)	4,1	Ампициллин	Эпициллин	0,22	0,29	9,0	11,3
н-Амиловый спирт	6,7	N-Ацетиламициллин	N-Ацетилэпициллин	0,22	0,31	10,5	14,0
н-Амиловый спирт	6,7	Пенициллин G	Пенициллин G	0,47	0,63	8,6	11,4
н-Амиловый спирт — амилацетат (3 : 1)	6,7	*п*-Оксибензилпенициллин	*м*-Оксибензилпенициллин	0,08	0,09	10,6	13,2
н-Бутиловый спирт — *трет*-амиловый спирт (2 : 1)	6,7	*п*-Оксиампициллин	*м*-Оксиампициллин	0,06	0,07	8,1	11,3

[а] Все подвижные фазы насыщены водой.

[б] Величины R_f измеряли, когда фронт растворителя доходил до края бумаги или пластинки.

и 6,7, а в качестве подвижных — насыщенные водой смеси низших спиртов. Результаты разделения критических пар лучше проследить по табл. 9.12.

9.8.11. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ТОКОФЕРОЛОВ

Аратани и др. [3] описали способ приготовления очень тонких слоев силикагеля на кварцевых пластинках размером 76×26×0,7 мм, оказавшихся весьма удобными для микроанализа токоферолов.

Две тщательно вымытые кварцевые пластинки, прикрепленные друг к другу зажимами, погружают в расплавленный парафин. После охлаждения их разделяют и погружают в 46%-ную плавиковую кислоту, подогретую до 30 °С, и выдерживают в ней в течение 20—60 мин (в зависимости от требуемой глубины травления). Далее пластинки дважды кипятят в дистиллированной воде, промывают ксилолом, метанолом и водой и сушат при 110 °С. На обработанные таким образом пластинки наносят суспензию силикагеля G (фирма Merck, фракция 325 меш) с помощью стеклянного валика, а избыток ее убирают плоским шпателем. Таким способом удается получить очень тонкий слой сорбента. Пластинки сушат при 110 °С и хранят в эксикаторе над сухим силикагелем.

Пробы токоферолов в виде бензольных растворов (6,1 мкг/мкл) наносят на пластинки микрошприцем фирмы Hamilton. Хроматографирование ведут в атмосфере азота в темноте при комнатной температуре. В этих целях используют стеклянную камеру (85×85×33 мм), которую помещают в вакуум-эксикатор. Элюентом служит смесь *н*-гексан — хлороформ (1 : 1). По окончании элюирования пластинки опрыскивают раствором батофенантролина и хлорида железа(III). Измерив с помощью двухлучевого спектрофотометра (Shimadzu, модель MPS-50) пропускание при 291 нм, строят калибровочную кривую для стандарта dl-α-токоферола и проводят количественные определения. Этим способом можно за 13 мин определить содержание токоферолов в пробе соевого масла (3,1 мкг) при толщине слоя силикагеля 53 мкм. Величины R_f α-, γ- и δ-токоферолов равны соответственно 0,74, 0,47 и 0,23.

9.8.12 РАЗДЕЛЕНИЕ ВИНКАЛЕЙКОБЛАСТИНА, ЛЕЙКОКРИСТИНА, ЛЕЙРОЗИНА И ЛЕЙРОЗИДИНА МЕТОДОМ ТСХ

Фарнсуорт и Гилински [13] разделили структурно очень близкие димерные алкалоиды *Vinca rosea* L. на тонких слоях силикагеля, элюируя их смесью хлороформ — метанол (95 :

: 5). Обнаружение проводили раствором сульфата церия-аммония. При этом были получены следующие величины R_f: лейрозидин 0,06±0,01, лейрокристин 0,16±0,03, винкалейкобластин 0,24±0,02, лейрозин 0,45±0,03, аймалицин 0,64±0,03.

Обзор методов систематического анализа многих типов алкалоидов посредством ТСХ опубликован Вальди и др. [72].

9.9. ОСНОВНЫЕ ОБНАРУЖИВАЮЩИЕ РЕАГЕНТЫ ДЛЯ БХ И ТСХ

В этом разделе приведены некоторые обнаруживающие реагенты (от ОР-1 до ОР-31), применяемые в бумажной и тонкослойной хроматографии. Если реагент пригоден только для какого-либо одного типа хроматографии, то это указывается особо.

А. НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ОБНАРУЖИВАЮЩИЕ РЕАГЕНТЫ

ОР-1. Бромкрезоловый зеленый или бромтимоловый синий

а. Раствор бромкрезолового зеленого (0,03%) в 80%-ном метаноле. К нему добавляют несколько капель 3%-ного водного раствора гидроксида натрия (8 капель на 100 мл реагента). Кислоты дают желтые пятна на зеленом фоне.

б. Бромтимоловый синий. 1. Смесь бромтимолового синего (50 мг), борной кислоты (1,25 г), 1 н. раствора гидроксида натрия (8 мл) и воды (112 мл); после опрыскивания хроматограммы выдерживают в парах аммиака, обнаруживаемые соединения дают белые пятна на темно-синем фоне. 2. 0,04%-ный раствор бромтимолового синего в 0,01 н. растворе гидроксида натрия.

ОР-2. Нитрат серебра

а. Сухую хроматограмму опрыскивают 5%-ным раствором нитрата серебра в 10%-ном водном аммиаке и нагревают в темноте 5 мин при 140 °С.

б. Хроматограмму опрыскивают 0,5 н. этанольным раствором гидроксида калия, нагревают 20 мин при 140 °С и опрыскивают 1%-ным раствором нитрата серебра в 30%-ной азотной кислоте. После этого хроматограмму рассматривают на свету и при УФ-облучении.

в. 0,1 н. раствор нитрата серебра смешивают с 3 н. раствором аммиака. Иногда целесообразно добавить также некоторое количество 2 н. раствора гидроксида натрия. Этим реагентом опрыскивают хроматограмму и сушат

ее 5—10 мин при 105 °С. При этом образуются темно-коричневые пятна на светло-коричневом фоне. Окраску фона можно ослабить, промывая хроматограмму 6 н. раствором аммиака или раствором тиосульфата. Реагент пригоден для БХ.

г. 0,1 мл насыщенного водного раствора нитрата серебра смешивают с 20 мл ацетона и затем по каплям добавляют воду, пока раствор снова не посветлеет. Хроматограмму погружают в этот раствор, затем подвешивают на час в камере, атмосфера которой насыщена парами аммиака. После этого хроматограмму сушат 5—7 мин при 80 °С и фиксируют пятна, промывая хроматограмму последовательно 10%-ным раствором тиосульфата натрия и водой. Этот метод пригоден для количественных определений, поскольку ацетон и пары аммиака препятствуют диффузии сахаров из пятен, и, таким образом, на хроматограмме получаются ясные, четкие пятна. Метод пригоден для БХ. В большинстве случаев окраска пятен от коричневато-серой до черной.

ОР-3. Флуоресцентные реагенты

а. Флуоресцеин: 0,2%-ный этанольный раствор флуоресцеина.

б. Морин: раствор 20 мг морина в 100 мл этанола. Этим раствором опрыскивают хроматограмму и наблюдают ее при УФ-облучении (лампы Philora и Chromatolite). Соединения, сильно поглощающие в УФ-области, ослабляют флуоресценцию, другие соединения флуоресцируют сильнее, чем фон.

ОР-4. Фосфомолибденовая кислота

а. 5%-ный метанольный раствор фосфомолибденовой кислоты. Хроматограмму нагревают 10 мин при 80 °С. Обнаруживаемые соединения дают синие пятна на желтом фоне; после дополнительного опрыскивания аммиаком фон обесцвечивается.

б. 20%-ный этанольный раствор фосфомолибденовой кислоты (с последующей обработкой парами аммиака, если это необходимо).

в. 10%-ный раствор фосфомолибденовой кислоты в метаноле или этаноле; чувствительность обнаружения можно увеличить, добавляя концентрированную соляную кислоту (4 мл на 100 мл раствора). Хроматограмму нагревают в течение минуты при 110 °С. Чтобы обнаружить насыщенные липиды, хроматограмму нагревают при 160—180 °С (целесообразно сначала прокалить хроматограмму и наносить реагент на еще горячую пластинку).

ОР-5. Хлорид сурьмы(III)

Насыщенный раствор хлорида сурьмы(III) в хлороформе или тетрахлорметане. После опрыскивания хроматограмму нагревают при 110 °С, пока не появятся окрашенные пятна. При обнаружении стероидов можно улучшить чувствительность, добавляя к раствору 10—20% тионилхлорида или 5% уксусного ангидрида.

ОР-6. Иод

а. Хроматограмму помещают в закрытую камеру, на дно которой насыпан тонкий слой кристаллов иода. Можно также выпаривать спиртовый или ацетоновый раствор иода, нанесенный на стеклянную пластинку. Затем эту пластинку с тонким слоем мельчайших кристалликов иода держат вплотную над хроматограммой.

б. 1%-ный раствор иода в этаноле (или метаноле) или 0,5%-ный раствор иода в хлороформе. После опрыскивания можно прогреть хроматограмму при 60 °С и рассматривать ее при УФ-облучении.

в. Раствор I: растворяют 1 г иода и 1 г иодида калия в 100 мл этанола. Раствор II: смесь 25%-ной соляной кислоты и этанола (1 : 1). Перед употреблением растворы I и II смешивают в соотношении 1 : 1.

г. Раствор Люголя: 0,3%-ный раствор иода в 5%-ном водном растворе иодида калия. Появляются коричневые или, как исключение, синие пятна на желтом фоне.

ОР-7. Серная кислота

Хроматограммы опрыскивают 96%-ной серной кислотой. Нагревают при 100 °С или на открытом пламени. Органические соединения при этом обугливаются. Некоторые соединения дают окрашенные пятна сразу после опрыскивания или после умеренного нагревания. Это универсальный способ обнаружения на слоях силикагеля и оксида алюминия (без некоторых органических связующих).

ОР-8. Серная кислота и хромовая кислота

а. 2,67 г триоксида хрома и 2,3 мл концентрированной серной кислоты тщательно размешивают в 100 мл воды. Полученным раствором хроматограмму опрыскивают и нагревают ее 15 мин при 100 °С.

б. 5 г бихромата калия растворяют в 100 мл 40%-ной серной кислоты.

в. Насыщенный раствор бихромата калия в концентрированной серной кислоте. Ненасыщенные липиды образуют светло-коричневые пятна сразу при опрыскивании, насыщенные — после нагревания.

ОР-9. Серная кислота с ванилином

а. Раствор 3 г ванилина в 100 мл этанола обрабатывают 3 мл концентрированной серной кислоты. Опрысканную хроматограмму нагревают 7 мин при 110 °С.

б. 1%-ный раствор ванилина в концентрированной серной кислоте.

в. 20%-ный этанольный раствор ванилина. Опрысканную этим раствором хроматограмму нагревают 10 мин при 80 °С, после чего опрыскивают 4 н. серной кислотой и нагревают 30 мин при 110 °С. В результате получаются окрашенные пятна.

ОР-10. Перманганат калия

а. 0,1 н. раствор перманганата калия.

б. 0,03—0,15 н. раствор перманганата калия подкисляют серной кислотой до получения раствора с концентрацией серной кислоты не более 0,3 н.

в. 1%-ный раствор перманганата калия в 2%-ном растворе карбоната натрия. Реагент пригоден для БХ. На фиолетовом фоне появляются пятна с окраской от белой до желтой, а при хроматографии на бумаге или силуфоле они становятся коричневыми.

ОР-11. Родамин В

а. Раствор 0,5 г родамина В в 100 мл этанола для обнаружения липидов. Образуются темно-фиолетовые пятна на розово-красном фоне.

б. Раствор I: 0,5%-ный этанольный раствор родамина В; раствор II: 10%-ный водный раствор карбоната натрия. Хроматограмму со слоем содержащего флуоресцентный индикатор силикагеля опрыскивают раствором I, сушат и вновь опрыскивают, но уже раствором II.

в. 1—5%-ный спиртовой раствор родамина В. Пластинку опрыскивают последовательно этим раствором, концентрированным раствором аммиака и раствором гидроксида натрия или аммиачным раствором нитрата серебра.

г. 0,2%-ный водный раствор родамина В. Хроматограмму рассматривают при УФ-облучении.

д. 0,05%-ный водный раствор родамина В. После опрыскивания этим реагентом пластинку опрыскивают 10 н. раствором гидроксида калия. Исследуемые соединения обнаруживаются на красном или фиолетовом фоне в виде светлых пятен, которые лучше видны с обратной (свободной от сорбента) стороны пластинки. Этот способ применяется для обнаружения главным образом на слоях, пропитанных парафиновым маслом.

е. 0,5%-ный раствор родамина В. Хроматограмму погружают в раствор и просушивают. На красном фоне появляются более светлые пятна. Реагент для БХ.

Б. ГРУППОВЫЕ ОБНАРУЖИВАЮЩИЕ РЕАГЕНТЫ

СПИРТЫ

Для обнаружения многоатомных спиртов и гликолей используют тетраацетат свинца (см. гл. 3). Образуются светлые пятна на коричневом фоне.

АЛКАЛОИДЫ

ОР-12. Реагент Драгендорфа

а. Модификация Мунье. Раствор I: в 800 мл воды растворяют 17 г основного нитрата висмута и 200 г винной кислоты. Раствор II: в 400 мл воды растворяют 160 г иодида калия. Растворы смешивают и 50 мл этой смеси разбавляют раствором 100 г винной кислоты в 500 мл воды. Исходный раствор остается устойчивым в течение нескольких месяцев, а разбавленный раствор — в течение нескольких недель.

б. Модифицированный реагент Драгендорфа. Раствор I: 1,7 г основного нитрата висмута в 100 мл 20%-ной уксусной кислоты. Раствор II: 40 г иодида калия в 100 мл воды. Перед употреблением 20 мл раствора I смешивают с 5 мл раствора II и 70 мл воды.

в. Раствор I: 0,850 г основного нитрата висмута в 50 мл 20%-ной уксусной кислоты. Раствор II: 8 г иодида калия в 20 мл воды. Смешивая эти растворы, получают исходный раствор, который остается устойчивым в течение нескольких месяцев. Перед употреблением его разбавляют двумя частями уксусной кислоты и 10 частями воды. Реагент пригоден для БХ. Образуются кирпично-красные пятна на желтом фоне.

АМИНОКИСЛОТЫ, АЛИФАТИЧЕСКИЕ И АРОМАТИЧЕСКИЕ АМИНЫ

ОР-13. Нингидрин

а. 0,1 г нингидрина растворяют в 40 мл абсолютного этанола и 10 мл ледяной уксусной кислоты.

б. 0,2%-ный раствор нингидрина в 95 мл *н*-бутанола и 5 мл 10%-ной уксусной кислоты. Хроматограмму нагревают 20 мин при 105 °С. Исследуемые соединения обнаруживаются в виде темно-фиолетовых пятен.

в. 0,2%-ный этанольный раствор нингидрина.

г. 0,2%-ный раствор нингидрина в ацетоне. Пригоден для БХ. Хроматограмму погружают в раствор, после чего сушат 5 мин в токе влажного воздуха, а затем выдерживают в комнате, в атмосфере которой не содержится паров аммиака. Аминокислоты обнаруживаются в виде сине-фиолетовых пятен после нескольких часов выдерживания, пептиды обнаруживаются только на следующие сутки.

ОР-14. Нитропруссид натрия

а. 5 г нитропруссида натрия растворяют в 100 мл 100%-ного водного раствора уксусного альдегида. Реагент смешивают с 2%-ным водным раствором карбоната натрия в соотношении 1 : 1.

б. Хроматограмму опрыскивают раствором 1 г нитропруссида натрия в смеси 4 мл уксусного альдегида и 21 мл воды; дают ей подсохнуть, но не полностью и после этого опрыскивают 10%-ным раствором карбоната натрия. Реагент пригоден для БХ.

ОР-15. *п*-Диметиламинобензальдегид (реагент Эрлиха)

а. 1%-ный этанольный раствор *х*-диметиламинобензальдегида. После опрыскивания хроматограмму выдерживают 3—5 мин в парах хлорида водорода.

б. 1 г *п*-диметиламинобензальдегида растворяют в 50 мл концентрированной соляной кислоты и полученный раствор смешивают с 50 мл этанола. Хроматограммы, элюированные кислотными системами, через 2—5 мин после извлечения из камеры опрыскивают до тех пор, пока слой не станет прозрачным. Хроматограммы, элюированные щелочными системами, нагревают 5 мин при 50 °С, затем опрыскивают этим реагентом и выдерживают в парах царской водки [смесь (3 : 1) концентрированных соляной и азотной кислот].

в. 0,25 г *п*-диметиламинобензальдегида растворяют в смеси 50 г уксусной кислоты, 5 г 85%-ной фосфорной кислоты и 20 мл воды. Раствор можно хранить до месяца в склянке из коричневого стекла. При опрыскивании получают пятна разных цветов.

САХАРА

ОР-16. Нафторезорцин

а. 100 мл 0,2%-ного спиртового раствора нафторезорцина смешивают с 10 мл фосфорной кислоты. Опрысканную хроматограмму нагревают 5—10 мин при 105 °С.

б. 0,2%-ной этанольный раствор нафторезорцина смешивают в соотношении 1 : 1 с 20%-ной серной кислотой.

Опрысканную хроматограмму нагревают 5—10 мин при 105 °C.

в. Смесь раствора 0,2 г нафторезорцина в 100 мл этанола с 20%-ной трихлоруксусной кислотой (1 : 1). При разделении кетонов хроматограммы выдерживают 5—10 мин при 105 °C, а при разделении уроновых кислот — 10—15 мин во влажной атмосфере при 70—80 °C.

г. 0,2%-ный раствор нафторезорцина в ацетоне смешивают непосредственно перед опрыскиванием с 2 н. фосфорной кислотой в соотношении 5 : 1. Опрысканную хроматограмму выдерживают при 90 °C. Реагент пригоден для БХ. Образуются окрашенные пятна.

ОР-17. Бифталат анилина

0,93 г анилина и 1,66 г фталевой кислоты растворяют в 100 мл насыщенного водой *н*-бутанола. Хроматограмму нагревают несколько минут при 105 °C, затем рассматривают при УФ-облучении. Образуются пятна с окраской от красной до коричневой.

ОР-18. Иодная кислота

а. 0,5%-ный раствор периодата натрия. После опрыскивания этим реагентом хроматограмму опрыскивают смесью 0,5 г бензидина, 20 мл уксусной кислоты и 80 мл абсолютного этанола.

б. Сначала опрыскивают хроматограмму 0,1%-ным водным раствором метапериодата натрия, дают ей подсохнуть в течение нескольких минут, затем все еще влажную хроматограмму опрыскивают раствором бензидина (2,8 г бензидина в смеси 80 мл 96%-ного этанола, 70 мл воды, 30 мл ацетона и 1,5 мл 1 н. соляной кислоты). В процессе обнаружения происходит расщепление сахарной цепи, а бензидин позволяет обнаружить непрореагировавший реагент. Получаются белые пятна на синем фоне. Реагент пригоден для БХ.

в. Хроматограмму опрыскивают сначала 0,05 н. раствором периодата натрия в 0,05 н. серной кислоте, через 15 мин смесью этиленгликоля, ацетона и концентрированной серной кислоты (50 : 50 : 0,3), а еще через 10 мин 6%-ным водным раствором 2-тиобарбитурата натрия и нагревают 5 мин при 100 °C.

г. Хроматограмму опрыскивают 2%-ным раствором периодата натрия и сушат 7 мин в атмосфере азота при 60 °C. После этого помещают в атмосферу SO_2 и опрыскивают раствором 1 г розанилина в 50 мл воды, который предварительно обесцвечивают SO_2 и объем которого доводят до литра. В течение 3—24 ч обнаружива-

ются все сахара, а также все соединения, содержащие вицинальную диольную группу. Образуются белые пятна на красном фоне. Метод пригоден для БХ.

ФЕНОЛЫ

ОР-19. Диазотированный *п*-нитроанилин

а. 5 мл 0,5%-ного раствора *п*-нитроанилина в 2 н. соляной кислоте смешивают с 6,5 мл 5%-ного раствора нитрита натрия, охлаждают и разбавляют 15 мл 20%-ного раствора ацетата натрия.

б. Хроматограмму опрыскивают 0,5 н. раствором гидроксида калия, 15 мин нагревают при 60 °С и опрыскивают смесью раствора 0,8 г *п*-нитроанилина в 20 мл 25%-ной соляной кислоты и 250 мл воды, к которой добавляют 5%-ный раствор нитрита натрия в количестве, достаточном для обесцвечивания.

в. Насыщенный раствор *п*-нитроанилина в 0,13 н. соляной кислоте смешивают с таким же объемом 1%-ного раствора нитрита натрия и добавляют 5%-ный раствор мочевины. Через несколько минут разбавляют раствор 7 частями воды. Появляются пятна с окраской от желтой до оранжевой. Реагент пригоден для БХ.

ОР-20. Диазотированная сульфаниловая кислота (реагент Паули)

а. 25 г сульфаниловой кислоты растворяют в 125 мл 10%-ного водного раствора гидроксида калия, охлаждают и смешивают со 100 мл 10%-ного раствора нитрита натрия. Реакционную смесь добавляют по каплям к помещенной в баню со льдом соляной кислоте (40 мл соляной кислоты с уд. массой 1,19, разбавленной 20 мл воды). Диазониевую соль отфильтровывают при отсасывании, промывают водой, этанолом и эфиром и сушат на воздухе. Соль следует хранить только в холодильнике. Для обнаружения применяют раствор 0,1 г диазониевой соли в 20 мл 10%-ного водного раствора карбоната натрия.

б. 1%-ный раствор сульфаниловой кислоты в 4%-ной соляной кислоте смешивают с 4,5%-ным раствором нитрата натрия и после непродолжительного отстаивания добавляют такой же объем 10%-ного раствора карбоната натрия. Все растворы должны быть свежеприготовленными. Получаются окрашенные пятна. Реагент пригоден для БХ.

ОР-21. Хлорид железа(III) — феррицианид калия

1,5%-ный раствор хлорида железа(III) смешивают в

соотношении 1:1 с 1%-ным раствором феррицианида калия. Реагент образует синие пятна, устойчив в течение 5 мин.

СОЕДИНЕНИЯ ФОСФОРА

ОР-22. Молибдат аммония

Хроматограмму опрыскивают смесью 3 г молибдата аммония, 50 мл воды, 5 мл 6 н. соляной и 13 мл 70%-ной хлорной кислот и нагревают 10 мин при 80 °С. Исследуемые соединения обнаруживаются в виде сине-черных пятен на белом фоне.

ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ

ОР-23. *п*-Аминобензойная кислота — цианхлорид

Раствор 2 г *п*-аминобензойной кислоты в 75 мл 0,75 н. соляной кислоты разбавляют этанолом до объема 100 мл. После опрыскивания хроматограмму выдерживают 6 мин в парах цианхлорида в закрытой камере, помещенной под вытяжным колпаком. Цианхлорид приготовляют, смешивая хлорамин с 20 мл 1 н. соляной кислоты и 10 мл 10%-ного раствора цианида калия. Производные пиридина и другие гетероциклические соединения окрашиваются в красный цвет.

ОР-24. Хлорид железа(III) — хлорная кислота (реагент Сальковского)

Смесь одной части 0,05 М раствора хлорида железа(III) и 50 частей 5%-ной хлорной кислоты. Иногда можно использовать более концентрированную хлорную кислоту. Реагент образует окрашенные пятна. Пригоден также для БХ.

ОР-25. Формальдегид — соляная кислота (реагент Прохазки)

Смесь одной части 35—40%-ного формальдегида, одной части концентрированной соляной кислоты и двух частей воды; после опрыскивания хроматограмму нагревают до полного высушивания. Реагент пригоден для БХ. Образуются пятна с окраской от желтой до коричневой. При более продолжительном нагревании бумага темнеет (обугливается). При использовании для ТСХ можно заменить воду на этанол и обработать высушенные хроматограммы парами азотной кислоты, повышая таким образом чувствительность обнаружения.

НИТРОСОЕДИНЕНИЯ

ОР-26. Хлорид олова(II)

Хроматограмму опрыскивают смесью 3 мл 15%-ного раствора хлорида олова, 15 мл концентрированной со-

ляной кислоты и 180 мл воды. После просушивания образовавшиеся амины можно обнаружить реагентом ОР-15.

ОРГАНИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ

См. ОР-1.

КАРБОНИЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

ОР-27. 2,4-Динитрофенилгидразин

150 мг 2,4-динитрофенилгидразина растворяют в 35 мл воды и добавляют к раствору 22 мл концентрированной соляной кислоты. Соединения, содержащие свободную карбонильную группу, дают пятна с окраской от желтой до оранжево-красной на светло-желтом фоне. В этих же целях можно применить раствор 50 мг 2,4-динитрофенилгидразина в смеси 10 мл метанола и 1—2 мл концентрированной соляной кислоты.

СЕРУСОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ

См. ОР-2.

ОР-28. Иодно-азидный реагент

Этот реагент получают смешивая 1,5 г азида натрия и 50 мл этанола с 50 мл 0,1 н. водного раствора иода, к которому добавляют иодид калия в количестве, необходимом для растворения иода. Реагент, попавший при опрыскивании хроматограммы на пятна серусодержащих соединений, обесцвечивается. Можно добиться увеличения чувствительности, дополнительно опрыскивая хроматограмму раствором крахмала. Реагент пригоден для БХ.

СТЕРОИДЫ

См. ОР-4, ОР-6, ОР-7.

ОР-29. *м*-Динитробензол (реагент Циммермана)

2%-ный раствор *м*-динитробензола в абсолютном этаноле; после опрыскивания этим раствором и высушивания хроматограмму опрыскивают 2,5 М раствором гидроксида калия и сушат при 70—100 °С, пока не появятся красно-фиолетовые пятна. Реагент пригоден для БХ.

ОР-30. Тетразолиевый синий

Одну часть 0,1%-ного раствора тетразолиевого синего разбавляют 9 частями 2 М раствора гидроксида натрия.

Тетразолиевый синий представляет собой хлорид 2,2-*п*-(ди-О - метокси) дифенилен - 3,3′,5,5′ - тетрафенилдитетразолия. Реагент пригоден для БХ. Восстанавливающие стероиды (и вообще восстанавливающие соединения) быстро окрашиваются в цвета от синего до фиолетового. Для ТСХ при обнаружении на пластинках со слоями силикагеля используют в 10—20 раз большие концентрации тетразолиевого синего и втрое большие концентрации гидроксида натрия, а воду можно заменить на метанол. Интенсивность окраски пятен на пластинках слабее, чем на бумаге.

ТЕРПЕНЫ

См. ОР-4, ОР-5.

ОР-31. Анисовый альдегид — серная кислота

а. Смесь уксусной кислоты, анисового альдегида и концентрированной серной кислоты (97 : 1 : 2).

б. Свежеприготовленная смесь 9 мл 95%-ного этанола, 0,5 мл концентрированной серной кислоты и 0,5 мл анисового альдегида. После опрыскивания хроматограмму нагревают 5—10 мин при 90—100 °С. Окраска пятен различная.

СПИСОК ИНОСТРАННЫХ ФИРМ, ВЫПУСКАЮЩИХ ХРОМАТОГРАФЫ

Analabs Inc., 80 Republik Drive, North Haven, Connecticut 06473, USA.
Analtech Inc., 75 Blue Hen Dr., Newark, Delaware 19711, USA.
Applied Science Laboratories Inc., P. O. Box 440, State College. Pennsylvania 16801, USA.
Bio-Rad Laboratories, Richmond, California 94804, USA.
CAMAG AG, 4132 Muttenz, Homburger Str. 24, Switzerland.
Chinoin, Nagytétény; representative: Medimpex, Budapest, Hungary.
Desaga C., GmbH, 6900 Heidelberg, Mass. Str. 26—28, BRD.
Eastman Kodak Company, 343 State Str., Rochester, New York 14650, USA.
Floridin Co., 3 Penn Center, Pittsburgh, Pa 15235, USA.
Fluka AG, 9470 Buchs, Switzerland.
Gelman Instrument Co., 600 South Wagner Road, Ann Arbor, Michigan 48106, USA.
Kavalier, n. p. Sázava, factory Votice; representative: Chemapol, Kodaňská 46, 100 10 Prague 10, Chechoslovakia.
Kodak-Pathé, Vincennes, Paris, France.
Kontes Glass Co., Spruce St., Vineland, New Jersey 08360, USA.
Macherey, Nagel und Co., Werkstrasse 6—8, 5160, Düren, BRD.
Mallinckrodt Chem. Works, 2nd and Mallinckrodt Str., St. Louis, Minnesota 63147, USA.
E. Merck AG, Frankfurter Str. 250, 6100 Darmstadt, BRD.
Pharmacia Fine Chemicals AB, 751 24, Uppsala, Box 604, Sweden.

---

* Более подробный список публикуется в J. Chromatogr. Sci. под заголовком «International Guide»; см., например, [1].

Phase Separation Ltd., Deeside Industrial Estate, Qulensferry, CH 52 LR Flintshire, U. K.
H. Reeve Angel and Co., 9 Bridewell Place, Clifton, New Jersey 07014, USA.
Research Specialities Co., 200 S. Garrach Boulevard, Richmond, California, USA.
Serva Entwicklungslabor, 6900 Heidelberg, Römerstr. 118, BRD.
Shandon Scientific Co., 65 Pound Lane, London. N. W. 10, England.
Schleicher und Schull GmbH, 3354, Dassel, BRD.
Supelco Inc., Supelco Park, Belle fonte, Pennsylvania 16823, USA.
M. Woelm — now INC Pharmaceutical GmbH und Co., 3440, Eschwege, BRD.

ЛИТЕРАТУРА

1. International Chromatography Guide, J. Chromatogr. Sci., **16**, No. 2, Gl (1978).
2. Thin-Layer Gel Filtration with the Pharmacia TLG-Apparatus, Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, 1974.
3. *Aratani T., Mita K., Mizui F.*, J. Chromatogr., **79**, 179 (1973).
4. *Arens A., Rauenbusch E., Irion E., Wagner O., Bauer K., Kaufmann W.*, Z. Physiol. Chem., **351**, 197 (1970).
5. *Banaszek A., Krowicki K., Zamojski A.*, J. Chromatogr., **32**, 581 (1968).
6. *Barbier M., Jäger H., Tobias H., Wyss E.*, Helv. Chim. Acta, **42**, 2440 (1959).
7. *Bergy M. E., Eble T. E.*, Biochemistry, **7**, 653 (1968).
8. *Betina V.*, in «Pharmaceutical Applications of Thin-Layer and Paper Chromatography» (Macek K., Ed.), Elsevier, Amsterdam, 1972, p. 503.
9. *Clifford M. N.*, J. Chromatorg., **94**, 261 (1974).
10. *Dévényi T., Hazai I., Ferenczi S., Báti J.*, Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., **6**, 385 (1971).
11. Хроматография в тонких слоях. Пер. с нем./Под ред. Э. Шталя. — М.: Мир, 1965.
12. *Elander R. P., Gordee R. S., Wilgus R. M., Gale R. M.*, J. Antibiot., 22, 176 (1968).
13. *Farns worth N. R., Hilinski I. M.*, J. Chromatogr., **18**, 184 (1965).
14. *Fike R. R.*, пат. США 3752744 (1973).
15. *Garner H. R., Packer H.*, Appl. Spectrosc., **22**, 122 (1967).
16. *Geiss F.*, Die Parameter der Dünnschichtchromatographie, Vieweg, Braunschweig, 1972.
17. *Geiss F.*, J. Chromatogr., **33**, 9 (1968).
18. *Heřmánek S.*, in: Chromatografie na tenké vrstvě (Lábler L., Schwarz V., Eds.), Nakladatelstvi ČSAV, Prague, 1965, p. 32.
19. *Hörhammer L., Wagner H., Macek K.*, Chromatogr. Rev., **9**, 103 (1967).
20. *Houpt P. M.*, X-Ray Spectrosc., **1** (1), **37** (1972).
21. *Hurtubise R. J., Lott P. F., Dias J. R.*, J. Chromatogr. Sci., **11**, 476 (1973).
22. *Itoh T., Tanaka M., Kaneho H.*, Lipids, 8, 259 (1973).
22a. *Janák J.*, J. Chromatogr., **78**, 117 (1973).
23. Количественная хроматография на бумаге и в тонком слое. Пер. с англ./ /Под ред. Э. Шелларда. — М.: Мир, 1971.
24. *Jork H., Kraus L.*, in: Methodicum Chemicum (Korte F., Ed.), Vol. 1, Thieme Verlag, Stuttgart, 1973, p. 78.
24a. *Jupillet H., Perry A.*, Science, **194, 288 (1976)**.
25. *Kaufman H. P., Mangold H. K., Mukherjee K. D.*, J. Lipid Res., 12, 506 (1971).
26. *Kirchner J. G.*, J. Chromatogr., Sci., **11**, 180 (1973).
27. *Kraus L., Stahl E.*, Arzneim. Forsch., **20**, 1814 (1970).
28. *Lábler L., Schwarz V.* (Eds.), Chromatografie na tenké vrstvě, Nakladatelství ČSAV, Praha, 1965, p. 62.

29. *Lábler L., Schwarz W. V.* (Eds.), Chromatografie na tenké vrstvě, Nakladatelství ČSAV, Praha, 1965, p. 82.
30. *Langner H. J., Teufel U.*, J. Chromatogr., **78**, 445 (1973).
31. *Lederer M., Polcaro C.*, J. Chromatogr., **84**, 379 (1973).
32. *Lepri L., Desideri P. G., Coas V.*, J. Chromatogr., **64**, 271 (1972).
33. *Litchfield C.*, Analysis of Triglycerides, Academic Press, New York, 1972, p. 50.
34. *Lin Y.-T., Wang K.-T., Yang T.-I.*, J. Chromatogr., **21**, 158 (1966).
35. *Lisboa B. P.*, in: Pharmaceutical Applications of Thin-Layer and Paper Chromatography (Macek K., Ed.), Elsevier, Amsterdam, 1972, p. 275.
36. *Loev B., Goodman M. M.*, Chem. Ind. (London), **1967**, 2026.
37. *Macek K.*, Ed., «Pharmaceutical Applications of Thin-Layer and Paper Chromatography», Elsevier, Amsterdam, 1972, p. 52.
37a. *Macek K., Hais M., Kopecký J., Schwarz W., Gasrarič J., Churáček J.* (Eds.), «Bibliography of Paper and Thin-Layer Chromatography», 1970—1973; «Survey of Applications», J. Chromatogr., Supplementary, Vol. No. 5, 1976.
38. *Macek K., Janák J., Deyl Z.*, Eds., «Current Abstracts», J. Chromatogr., например, J. Chromatogr., **107**, B-107 (1975).
39. *McGilveray I. J., Strickland R. D.*, J. Pharm. Sci., **56**, 77 (1967).
40. *Morris L. J., Nichols B. W.*, «Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods» (Niederwieser A., Ed.), Vol. 1, Ann Arbor Science Publ., Ann Arbor, Mich., 1972, p. 74.
41. *Motl O., Stránský K., Novotný L., Ubik K.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **79**, 28 (1977).
42. *Neher N.*, in: Thin Layer Chromatography (Marini-Bettòlo G. B., Ed.), Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 75.
43. *Nilsson C. A., Norstrom A., Andersson K.*, J. Chromatogr., **73**, 270 (1972).
44. *Okumura T., Kadono T., Nakatani M.*, J. Chromatogr., **74**, 73 (1972).
45. *Pan S. C.*, J. Chromatogr., **79**, 251 (1973).
46. *Pelich N., Bolliger H. R., Mangold H. K.*, in: Advances in Chromatography (Giddings J. C., Keller R. A., Eds.), Vol. 3, Dekker, New York, 1966, p. 85.
47. *Perry J. A., Haag K. W., Glunz L. J.*, J. Chromatogr. Sci., **11**, 447 (1973).
48. *Pitra J., Štěrba J.*, Chem. Listy, **56**, 544 (1962).
49. *Prasad R. S., Gupta A. S.*, Sukh Dev., J. Chromatogr., **92**, 450 (1974).
50. *Privett O. S., Doucherty K. A., Erdahl W. L.*, in: Quantitative Thin-Layer Chromatography (Touchstone J. O., Ed.), Wiley, New York, 1973, p. 57.
51. *Procházka Z., Stárka L.*, J. Chromatogr., **78**, 149 (1973).
52. *Rábek B.* (Ed.), Collection of Instructions for Use of Silufol Sheets, Kavalier Glassworks, Votice, Czechoslovakia, 1973.
53. Ref. [52], p. 14.
54. *Radola B. J.*, J. Chromatogr., **38**, 61 (1968).
54a. *Ripphahn J., Halpaap H.*, J. Chromatogr., **112**, 81 (1975).
55. *Rokos J. A. S.*, J. Chromatogr., **74**, 357 (1972).
56. *Scott R. M., Lundeen M.*, Thin-Layer Chromatography Abstracts 1971—1973, Ann Arbor Science Publ., Ann Arbor, Mich, 1973.
57. *Scott R. M.*, J. Chromatogr. Sci., **11**, 129 (1973).
58. *Snyder L. R.*, J. Chromatogr., **92**, 223 (1974).
59. *Snyder L. R.*, Principles of Adsorption Chromatography, Dekker, New York, 1968.
60. *Spitschan R.*, J. Chromatogr., **61**, 169 (1971).
61. *Stahl E.*, Z. Anal. Chem., **221**, 3 (1966).
62. *Шталь Э.* (ред.), Хроматография в тонких слоях. Пер. с нем. — М.: Мир, 1965.
63. Idem. ibid., p. 50.
64. *Stahl E., Kraus L.*, Arzneim. Forsch., **19**, 684 (1969).
65. *Székely G.*, J. Chromatogr., **48**, 313 (1970).
66. *Tortolani J. G., Colosi M. E.*, J. Chromatogr., **70**, 182 (1972).

67. *Touchstone J. C.* (Ed.), Quantitative Thin-Layer Chromatography, Wiley, New York, 1973.
68. *Tucker B. V., Houston B. J.,* J. Chromatogr., **42**, 119 (1969).
69. *Ullman M. D., Radin N. S.,* J. Lipid Res., **13**, 422 (1972).
70. *Vique E.,* Grasas Aceites, **11**, 223 (1960).
71. *Viricel M., Gonnet C., Lamotte A.,* Chromatographia, **7**, 345 (1974).
72. *Waldi D., Schnackerz K., Munter F.,* J. Chromatogr., **6**, 61 (1961).
73. *Wessels H.,* Fette, Seifen, Anstrichm., **75**, 478 (1973).
74. *Wiedenhof N.,* J. Chromatogr., **15**, 100 (1964).
75. *Yasuda K., J.* Chromatogr., **72**, 413 (1972).
76. *Zweig G., Sherma J.,* Anal. Chem., **50**, 50R (1978).

Глава 10. Газовая хроматография

Р. КОМЕРС

Институт основ химических процессов
Чехословацкой Академии наук, Прага

М. КРЕЙЧИ

Институт аналитической химии
Чехословацкой Академии наук, Брно

СПИСОК ОБОЗНАЧЕНИЙ

A — коэффициент вихревой диффузии (10.16);
B — коэффициент диффузии растворенного вещества в газе-носителе (10.17);
C_L — коэффициент массопереноса в жидкой фазе (10.18);
C_g — коэффициент массопереноса в газовой фазе (10.19);
$C^0{}_C$ — стандартная мольная свободная энергия конденсации (10.47);
I — индекс удерживания (10.44);
R_s, $R_{1,2}$ — коэффициент разделения;
s — концентрационно-зависимая чувствительность детектора (10.27);
s' — чувствительность детектора, зависящая от массы (10.29);
T_c — абсолютная температура колонки;
T_m — абсолютная температура, измеренная в потоке газа-носителя (10.7);
V_G — объем газа в колонке (10.1);
V_g — удельный объем удерживания (10.8);
V_L — объем неподвижной жидкой фазы в колонке (10.1);
V_N — чистый объем удерживания (10.5);
V_R — полный объем удерживания (10.3);
V'_R — исправленный объем удерживания (10.3);
Y_t — ширина хроматографического пика на уровне нулевой линии, измеренная в единицах времени (10.11) (определяется как отрезок, отсекаемый на нулевой линии касательными к сторонам пика в точках перегиба);
${}^{pT}V_N$ — объем удерживания, исправленный с учетом давления и температуры (10.7);

$r_{1,2}$ — отношение удерживания (относительная летучесть) (10.23, 10.24);
n_{ef} — эффективное число теоретических тарелок (10.14);
w_s — масса неподвижной фазы (10.8);
k_A — константа адсорбционного равновесия (10.53);
γ — коэффициент замедления (10.17);
γ_0 — коэффициент активности (10.34);
ΔG^E — парциальная мольная свободная энергия Гиббса (10.36, 10.39, 10.31);
$\Delta G^0{}_s$ — стандартная свободная энергия адсорбции (10.35).

10.1. ВВЕДЕНИЕ

10.1.1. ОТКРЫТИЕ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Описанный Цветом [85] в 1906 г новый метод разделения не был оценен по достоинству и привлек внимание химиков лишь 25 лет спустя, когда Кун, Винтерштейн и Ледерер [51] вновь открыли его. В 1941 г. Мартин и Синдж [58] опубликовали статью с описанием нового аналитического метода — жидко-жидкостной хроматографии. Это открытие было настолько важным и оказало такое влияние на развитие химического анализа, что авторы его впоследствии были удостоены Нобелевской премии. Мартин и Синдж всегда полагали, что в качестве подвижной фазы в предложенном ими методе можно использовать и газы, однако осуществить эту идею удалось далеко не сразу; лишь 10 лет спустя Мартин и Джеймс доказали справедливость этого предположения и разработали основы исключительно эффективного практически универсального аналитического метода. Они продемонстрировали преимущества нового метода на примере разделения летучих жирных кислот и показали, что вследствие низкой вязкости газа по сравнению с вязкостью жидкой подвижной фазы и во много раз более быстрой диффузии в газовой фазе разделение с применением газа-носителя проходит значительно быстрее, и поэтому такой метод более удобен для рутинных анализов. Почти одновременно Янак [41] опубликовал работу, посвященную разделению углеводородов методом газо-адсорбционной хроматографии.

10.1.2. ОСНОВЫ ТЕОРИИ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Мы не ставим себе задачей изложить в данном разделе общую теорию хроматографии, этому вопросу посвящена гл. 2 данной монографии. Наша цель — обсудить основные соотношения газовой хроматографии и рассмотреть возможность их применения в хроматографической практике. Как и все типы

хроматографии, газовая хроматография является методом разделения, в котором анализируемые соединения разделяются между двумя фазами: неподвижной и подвижной. Подвижной фазой всегда служит газ, неподвижной фазой — чаще всего жидкость, нанесенная на неподвижную инертную подложку, или поверхностно-активный адсорбент. Иногда эти материалы вызывают как адсорбцию, так и растворение. В соответствии с различными методиками различают фронтальную, вытеснительную и проявительную газовую хроматографию (см. разд. 1.3). Сегодня термин «газовая хроматография» в основном означает проявительную хроматографию. Абсолютное большинство исследований проводится по этому принципу. В соответствии с методикой хроматографии небольшой объем анализируемой смеси вводят в колонку одной порцией. Отдельные компоненты смеси выходят из колонки поочередно. Хроматографирование ведут в таких условиях, чтобы форма пиков компонентов, регистрируемых самописцем по сигналу детектора, была как можно ближе к гауссовой кривой и чтобы ширина пиков была как можно меньше.

Газохроматографические системы в соответствии с типом используемых неподвижных фаз подразделяются на газо-жидкостные и газо-твердофазные. В газо-жидкостных системах энтальпия растворения является основным фактором, определяющим удерживание компонента в колонке, в газо-адсорбционных системах таким фактором является энтальпия адсорбции. Фазовое равновесие в данных системах описывается изотермой сорбции (адсорбции или растворения). Для приготовления высокоэффективных колонок выбор хроматографической системы должен проводиться с учетом требования линейности изотерм адсорбции. Использование нелинейных изотерм вызывает искажение формы пиков (рис. 10.1), что приводит к ухудшению разделения (уменьшение эффективности колонки) и более сложному количественному представлению хроматограмм (часть пиков остаются неразрешенными).

Поскольку задача хроматографии — разделение веществ, хроматографисты-теоретики изучают в первую очередь те факторы и явления, которые непосредственно воздействуют на эффективность процесса. Эффективность разделения прежде всего зависит от скорости миграции молекул исследуемого соединения через колонку, которая в свою очередь зависит от распределения компонента между неподвижной и подвижной фазами, т. е. от наклона изотермы или константы распределения. Такое же большое внимание уделяется и размыванию хроматографических пиков, вызываемому неравновесностью распределения вещества между неподвижной и подвижной фазами, диффузией в газовой фазе и т. д. Основным количественным выра-

жением первого явления служит время удерживания t_R (также называемым временем элюирования) (с, мин) или объем удерживания V_R (мл). Основным количественным выражением второго явления служит число теоретических тарелок n (безразмерная величина) или высота, эквивалентная теоретической тарелке, H (мм).

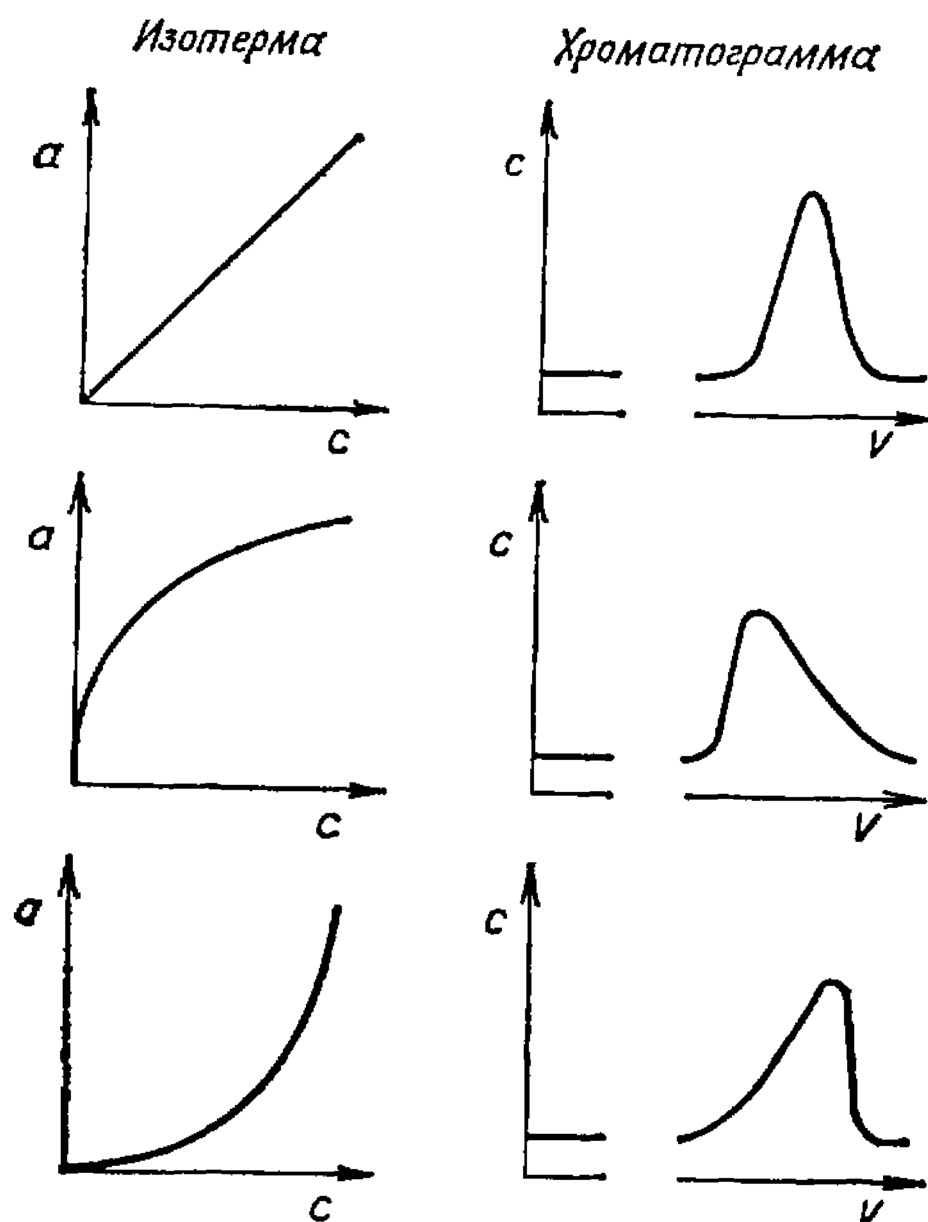


Рис. 10.1. Зависимость формы хроматографических пиков от вида изотерм адсорбции.

Концентрация компонента: *a* — в неподвижной фазе; *c* — в подвижной фазе; *г* — объем газа-носителя.

ОСНОВНЫЕ СООТНОШЕНИЯ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЕ УДЕРЖИВАНИЕ

Как уже отмечалось ранее, если в колонку введено достаточно малое количество анализируемого вещества и если процесс происходит в линейной области изотермы адсорбции, форма концентрационных пиков, детектируемых на выходе из колонки, близка к форме гауссовой кривой распределения ошибок. Время от момента ввода пробы в колонку до момента регистрации максимума пика называется временем удерживания, или временем элюирования t_R. При оптимальных условиях оно не зависит от количества введенной пробы и определяется только констан-

той распределения K_D, которая представляет собой отношение массы вещества, растворенного в 1 мл неподвижной фазы, к массе вещества, растворенного в 1 мл подвижной фазы.

$$k = K_D \frac{V_L}{V_G} = \frac{\text{Количество вещества в неподвижной фазе}}{\text{Количество вещества в подвижной фазе}}, \quad (10.1)$$

где k — фактор емкости [см. уравнение (10.9)], V_L — объем неподвижной жидкой фазы в колонке, V_G — объем газа в колон-

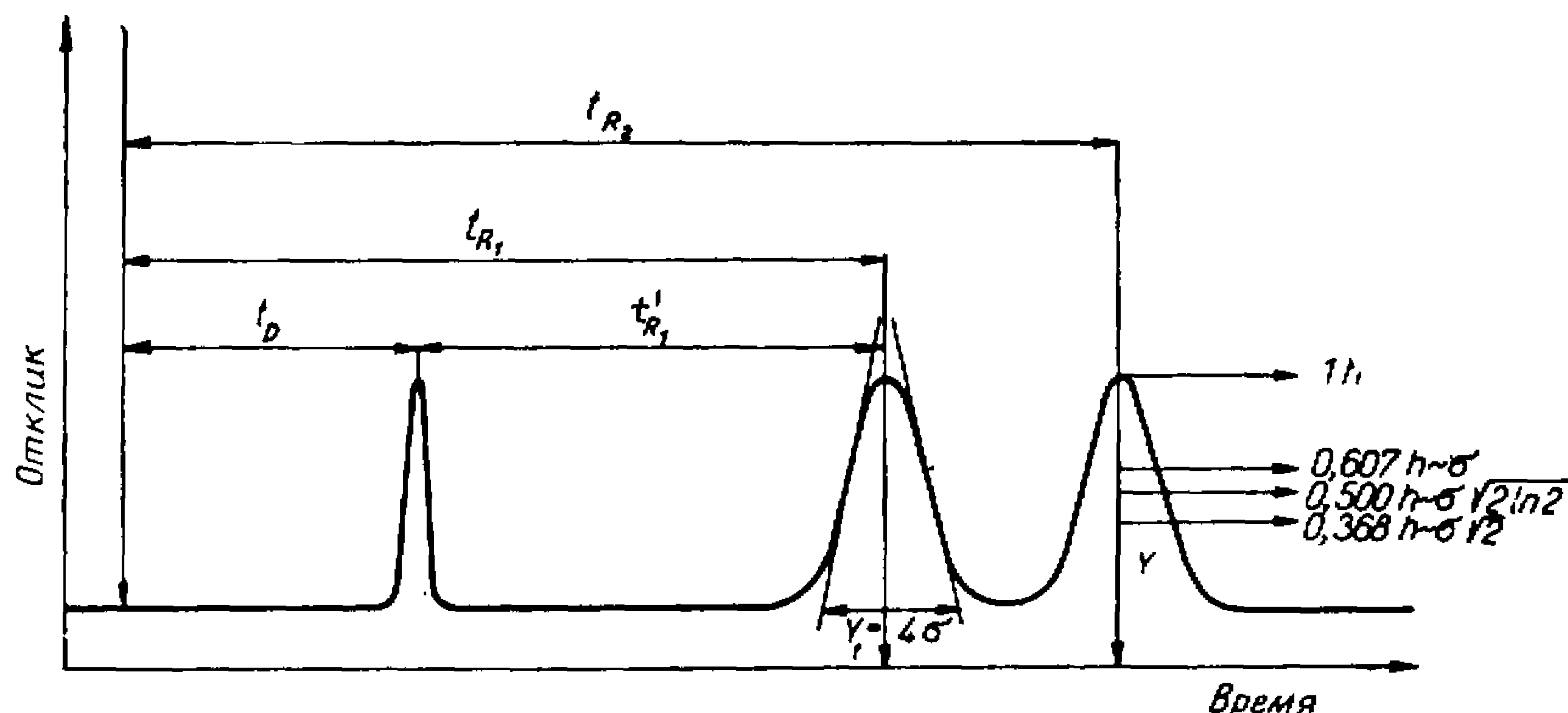


Рис. 10.2. Пример хроматограммы.

t_D — мертвое время удерживания; t_R — время удерживания; t'_R — исправленное время удерживания, индексы 1 и 2 соответствуют первому и второму анализируемым компонентам; Y_t — ширина пика на нулевой линии; σ — стандартное отклонение. Ширина пика Y выражается стандартным отклонением в зависимости от относительной высоты пика h, на которой она измерена.

ке. Если компонент смеси не сорбируется, $k = K_D = 0$. Время удерживания такого компонента называют мертвым временем удерживания t_M; оно пропорционально длине хроматографической колонки L (см) и обратно пропорционально средней скорости потока газа-носителя $\bar{u}$ (см/с):

$$t_M = L/\bar{u} \quad (10.2)$$

где $\bar{u}$ задается $u_0 j$, u_0 — линейная скорость потока на выходе из колонки и j — поправочный коэффициент, учитывающий перепад давления в колонке [см. уравнение (10.4)]. Следовательно, время удерживания — это интервал между моментом ввода вещества в колонку и моментом появления максимума пика, отмечаемого детектором. На практике этот интервал всегда измеряют по хроматограмме (рис. 10.2). Поскольку скорость перемещения ленты, на которой записывается хроматограмма, известна, измерив на хроматограмме расстояние между точкой ввода пробы и максимумом пика (X см), легко рассчитать время удерживания по формуле $t_R = X/w$.

Однако чаще пользуются не временем удерживания, а объемом удерживания, который рассчитывают по времени удерживания и измеренной на выходе объемной скорости потока газа-носителя F_m (см^3/с): $V_R=t_RF_m$. Объем удерживания складывается из мертвого объема колонки и собственно объема удерживаемого вещества в колонке, поэтому исправленный объем удерживания определяется как

$$V'_R=V_R-V_M \qquad (10.3)$$

До сих пор мы не принимали во внимание сжимаемость газа-носителя, между тем сжимаемость газа приводит к увеличению объема газа и скорости его потока. Поэтому при определении действительного объема удерживания в расчетную формулу вводят поправочный коэффициент

$$j=[3(p_i/p_0)^2-1]/[2(p_i/p_0)^3-1] \qquad (10.4)$$

т. е. действительный объем удерживания

$$V_N=jV'_R. \qquad (10.5)$$

Действительный объем удерживания связан с коэффициентом распределения следующим соотношением:

$$V_N=K_DV_L \qquad (10.6)$$

Объем удерживания, пересчитанный для атмосферного давления и рабочей температуры, называют исправленным объемом удерживания ${}^{pT}V_N$; он дается соотношением

$${}^{pT}V_N=jV'_R(p_0T_c/760T_m) \qquad (10.7)$$

где T_c — температура колонки и T_m — температура, при которой измеряется скорость газа-носителя (и та и другая температура измеряется в кельвинах).

Удельный объем удерживания V_g — это объем удерживания, отнесенный к единице массы неподвижной фазы (газо-жидкостная система) или к единице площади поверхности адсорбента S (газо-адсорбционная система). Удельный объем удерживания чаще всего используют в количественном анализе (см. разд. 10.4.2), его определяют как

$$V_g=[j(t_R-t_M)F_m/w_s](273/T_c) \qquad (10.8)$$

где F_m — скорость потока газа-носителя, измеренная на выходе из колонки (мл/с), w_s — масса неподвижной жидкой фазы (г), T_c — температура колонки (К). Удельный объем удерживания не зависит от типа используемой аппаратуры.

В адсорбционной хроматографии удельный объем удерживания определяют с помощью этого же уравнения, но массу не-

подвижной жидкой фазы w_s заменяют на удельную поверхность адсорбента S (м²/г).

В выражения для определения фактора емкости k [уравнение (10.1)] вводят величины объемов удерживания, которые можно заменить на время удерживания. Преимущество такого выражения основано на простоте экспериментального определения фактора емкости, который является отношением чистого объема удерживания (или времени) к мертвому объему (или времени):

$$k=(t_R-t_M)/t_M \quad (10.9)$$

Можно также ввести соотношение между временем удерживания, длиной колонки L (см), линейной скоростью подвижной фазы $\bar{u}$ (см/с) и фактором емкости:

$$t_R=(L/\bar{u})(1+k) \quad (10.10)$$

Данные выше соотношения описывают фазовое равновесие в хроматографической колонке. Для одних и тех же соединений и одной и той же неподвижной фазы (в большинстве случаев газ-носитель не влияет на характеристики удерживания) при заданных условиях (температура, давление) константу распределения можно рассчитать исходя из хроматографических данных, а если известна константа распределения, то для выбранной системы можно также рассчитать параметры удерживания. Удерживание одного компонента изучается лишь в исключительных случаях. Обычно необходимо выбрать подходящие хроматографическую систему и неподвижную фазу для анализа смеси нескольких соединений. При этом количественной мерой достигнутого разделения служит разрешение кривых удерживания для двух наиболее трудно разделяемых соединений 1 и 2.

Разрешение $R_{1,2}$ определяется следующим соотношением:

$$R_{1,2}=2(t_{R,2}-t_{R,1})/(Y_{t,1}+Y_{t,2}) \quad (10.11)$$

где Y — ширина хроматографического пика, или расстояние между точками пересечения нулевой линии касательными к хроматографическому пику в точках перегиба (рис. 10.2); индекс t указывает, что размерность Y — время. Ширину пика (в миллиметрах) можно измерить непосредственно на хроматограмме, но при этом необходимо также по хроматограмме определить интервалы удерживания и использовать их вместо времен удерживания.

В газовой хроматографии наблюдается, что для близко расположенных друг к другу пиков $Y_1=Y_2$, а для пиков гауссовой формы $Y=4\sigma$ (рис. 10.2), где σ — стандартное отклонение.

В этом случае уравнение (10.11) принимает такой вид:

$$R_{1,2}=(t_{R,2}-t_{R,1})/4\sigma \qquad (10.12)$$

Разрешение $R_{1,2}=1$ называют 4σ-разрешением; наблюдаемое при этом перекрывание пиков составляет всего примерно 2%. Удовлетворительное разрешение достигается и при $R_{1,2}=1{,}5$, но $R_{1,2}\leqslant 0{,}8$ обычно неприемлемы. Итак, увеличение $R_{1,2}$ приводит к улучшению разделения. Добиться этого на практике можно двумя путями. Во-первых, увеличить разность времен удерживания. Эта разность увеличится, если понизить температуру колонки, но такое понижение температуры всегда сопровождается расширением пиков; то же самое происходит и при использовании колонок большей длины. Однако разность времен удерживания пропорциональна длине колонок, тогда как размывание зон пропорционально корню квадратному из длины колонки. Обычно увеличение длины колонки приводит к улучшению разделения. Следовательно, необходимо оптимизировать каждую систему таким образом, чтобы добиться минимального размывания хроматографических пиков при максимальном увеличении разности объемов удерживания, а для этого необходимо знать причины, вызывающие размывание пиков, и соотношения между размыванием пиков и разрешением.

РАЗМЫВАНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ЗОН

Теория размывания хроматографических пиков, основы которой заложены ван Деемтером и сотр. [86] и Клинкенбергом и сотр. [44], коротко рассматривались нами в гл. 2. В этом разделе мы перечислим причины неидеальности хроматографического процесса, приведем ряд соотношений, позволяющих проводить количественные расчеты, а также дадим некоторые практические рекомендации, позволяющие избежать размывания пиков.

Одним из основных параметров, характеризующих размывание пиков, является число теоретических тарелок n, которое пропорционально квадрату отношения времени удерживания к ширине пика. Для расчета n чаще всего используется соотношение

$$n=16\,(t_R/Y_t)^2=(t_R/\sigma_t)^2 \qquad (10.13)$$

если ширина пика измерена на уровне нулевой линии (см. рис. 10.2), или

$$n=5{,}545\,(t_R/Y_{t,\,h/2})^2 \qquad (10.13а)$$

если ширина пика измерена на его полувысоте. Обычно ширину пика можно измерять на любой высоте, так как соотношение

между высотой и шириной пика формы гауссовой кривой известно.

Иногда удобнее пользоваться параметром n_{ef} — число эффективных теоретических тарелок

$$n_{эф} = [k/(1+k)]^2 n = 16 [(t_R - t_M)/Y_t]^2 = (t'_R/\sigma_t^2) \quad (10.14)$$

Ширина пика, отнесенная к единице длины колонки, определяет высоту, эквивалентную теоретической тарелке, H:

$$H = \sigma^2_L / L = L/n \quad (10.15)$$

где L — длина колонки и σ_L — стандартное отклонение пика в единицах длины. Пытаясь добиться оптимального разрешения

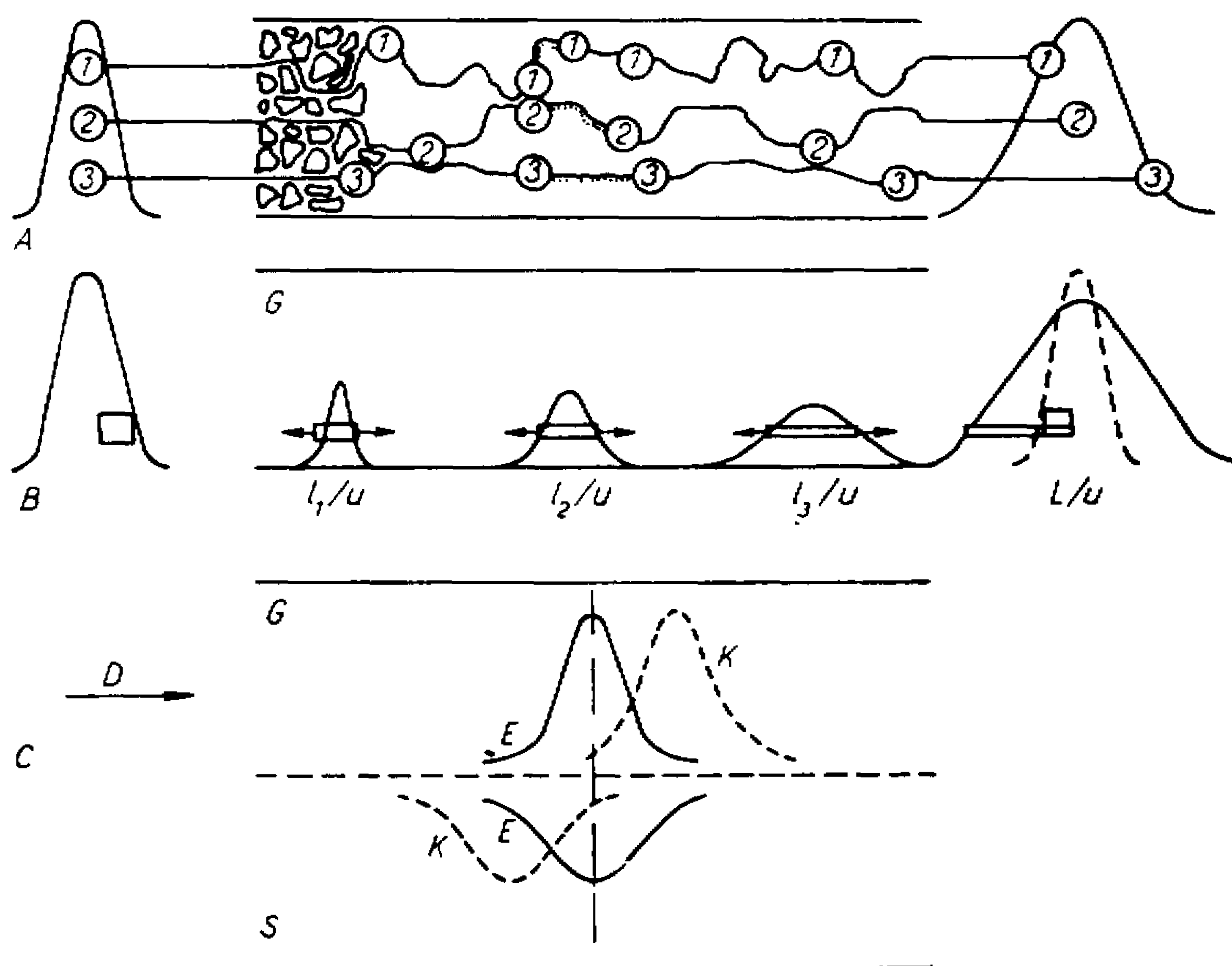


Рис. 10.3. Схема, объясняющая характер диффузионных процессов в хроматографии.

A — вихревая диффузия; B — диффузия в газовой фазе; C — межфазный массоперенос; D — направление потока газовой фазы; E — равновесное состояние; G — газовая фаза; K — действительная концентрация; l — длина колонки по ординате; L — полная длина колонки; S — неподвижная фаза; u — линейная скорость газа-носителя; 1—3 — фракции анализируемых соединений.

пиков, преследуем две цели: получить минимальное размывание пиков, т. е. максимальное значение n, и минимальное значение H за возможно более короткое время. По этой причине важно знать факторы, связывающие размывание пика со скоростью потока газа-носителя.

Хроматографические кривые размываются в результате диффузионных процессов. На рис. 10.3 схематически показаны три основных типа диффузионных процессов, приводящих к размыванию хроматографических зон: A — вихревая диффузия, B — диффузия в газовой фазе, C — межфазный массоперенос.

Вихревая диффузия описывается уравнением

$$A = \lambda d_p \qquad (10.16)$$

где λ — коэффициент, характеризующий гомогенность упаковки колонки; d_p — средний диаметр частиц; λ — член, характеризующий не только распределение частиц по размерам, но и взаимное расположение частиц. Обычно значение λ находится в интервале от 1 до 8. Вклад вихревой диффузии в размывание пиков не зависит от скорости потока газа-носителя. Механизм размывания под действием вихревой диффузии представлен в упрощенном виде на рис. 10.3. Можно предположить, что порция раствора, введенная в указанную секцию колонки, разделена на большое число маленьких порций равного размера, каждая из которых движется через колонку независимо. Из-за неодинаковости размера, формы и расположения частиц упаковочного материала длина пути этих отдельных порций может различаться. Поскольку скорость потока газа-носителя в данной секции колонки постоянна, то расстояния, проходимые веществом в потоке, равны для всех порций, но их проекции на плоскость сечения, параллельную оси колонки, различны, и в результате время, за которое эти порции пройдут эту секцию колонки, также различно.

Продольная диффузия в газовой фазе описывается уравнением

$$B = 2\gamma D_m \qquad (10.17)$$

где D_m — коэффициент диффузии растворенного вещества в газе-носителе и γ — коэффициент замедления, отражающий влияние неравномерности диаметра межчастичных и внешних капилляров в упаковке колонки на подавление диффузии ($\gamma < 1$). Продольная диффузия имеет место только в газовой фазе и зависит от времени, в течение которого исследуемое вещество находится в этой фазе. Следовательно, вклад ее в размывание пика обратно пропорционален скорости потока газа-носителя.

Межфазный массоперенос обусловлен отклонениями концентраций в подвижной и неподвижной фазах от равновесных, что показано схематически на рис. 10.3. Это явление описывается уравнением

$$C_L = 2k/3\,(1+k)^2 \cdot d_f^2/D_L \qquad (10.18)$$

где d_f — гипотетическая толщина пленки неподвижной фазы; D_l — коэффициент диффузии вещества в неподвижной фазе и

R — фактор емкости. Очевидно, что состояние системы тем ближе к равновесному (таким образом, размывание меньше), чем медленнее раствор проходит через колонку. Поэтому размывание пропорционально скорости газа-носителя.

Кроме массопереноса в неподвижной фазе существует массоперенос в подвижной фазе (C_g), вызванный негомогенностью радиального распределения концентраций. Их значение очевидно из рис. 10.3. Коэффициент массопереноса в газовой фазе выражается уравнением

$$C_g = k^2 d_p^2 / 100 D_m (1+k)^2 \qquad (10.19)$$

вклад в размывание вновь пропорционален скорости потока газа-носителя.

Итак, мы описали отдельные диффузионные процессы, чей вклад в размывание хроматографических пиков наиболее важен. Из приведенных уравнений следует, что, меняя размер частиц (d_p), количество неподвижной фазы (d_f), структуру сорбента и упаковку колонок (λ, γ), а также подвижную фазу, можно тем самым менять и D_m. Система растворенное соединение — неподвижная фаза в большинстве случаев задается, поэтому существенно влиять на величины k и D_L практически невозможно. В тех случаях, когда влияние отдельных процессов на размывание пика взаимно независимо, зависимость высоты, эквивалентной теоретической тарелке, от скорости газа-носителя выражается уравнением, приведенным в работе [86]:

$$H = A + B/u + Cu. \qquad (10.20)$$

где $C = C_L + jC_g$ [коэффициент см. в уравнении (10.5)]. Решая совместно уравнения (10.16)—(10.19), получаем наиболее часто используемое уравнение

$$H = 2\lambda d_p + 2\gamma D_m/u + 2kd_f^2 u/3(1+k)^2 D_L + k^2 d_p^2 uj/100 D_m (1+k)^2 \qquad (10.21)$$

Последний член уравнения обычно характеризуется наименьшей величиной. Очевидно, что уравнения (10.20) и (10.21) — это уравнения гиперболы, и для определения минимальной высоты, эквивалентной теоретической тарелке, и соответствующей (оптимальной) скорости газа-носителя имеем уравнения

$$H_{min} = A + 2(BC)^{1/2}; \quad u_{opt} = (B/C)^{1/2} \qquad (10.22)$$

Соответствие экспериментальным данным очевидно из рис. 10.4. Величина A определяется точкой пересечения H с осью ординат. Тангенс угла наклона касательной при высоких скоростях потока дает C. Член B можно рассчитать из уравнения для H (при выбранном значении u) или можно построить зависимость H от $1/u$ [75]. Рис. 10.4 ясно показывает влияние выбранного

газа-носителя. Если желательно дифференцировать относительные вклады в C массопереноса в жидкой и газовой фазах, обычно используют два газа-носителя. В этом случае члены A и C_L в уравнениях (10.20) и (10.21) должны быть равны для обоих газов. Значения C_g можно затем рассчитать [75].

Высота, эквивалентная теоретической тарелке, и число теоретических тарелок дают размывание пика. Объединяя различия

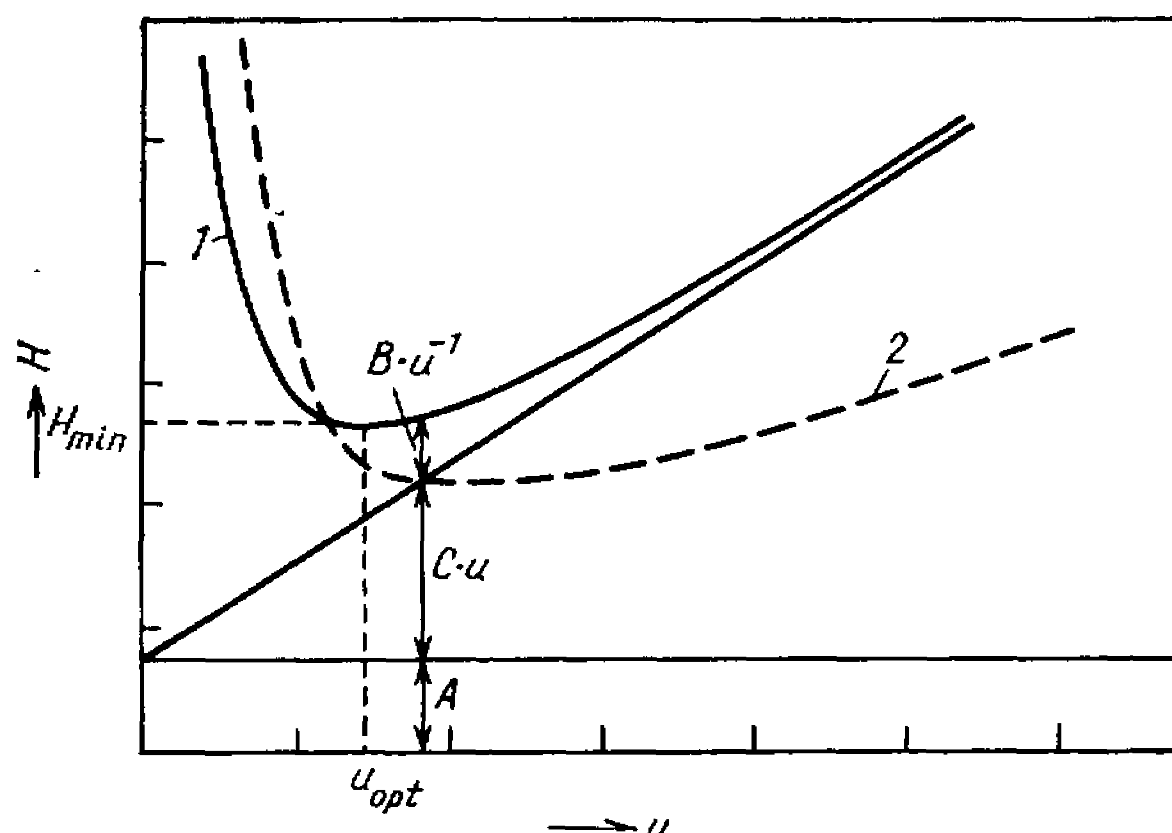


Рис. 10.4. Оценка экспериментальных данных, характеризующих зависимость высоты, эквивалентной теоретической тарелке, H от линейной скорости газа-носителя u.

A — вихревая диффузия; B — диффузия в газе-носителе; C — межфазный массоперенос; H_{min} — минимальная высота, эквивалентная теоретической тарелке; u_{opt} — линейная скорость газа-носителя, соответствующая H_{min}. n — газ-носитель: 1 — азот; 2 — водород.

в характеристиках элюирования в соотношении элюирования $r_{1,2}$ (иногда его также называют летучестью α)

$$r_{1,2}=t'_{R,1}/t'_{R,2}=V_{N,1}/V_{n,2}=V_{g,1}/V_{g,2}= =K_{D,1}/K_{D,2}=k_1/k_2 \quad (10.23)$$

с уравнениями (10.14) и (10.11), получаем соотношение для разрешения:

$$R_s=[(r_{1,2}-1)/4r_{1,2}]\,(n_{ef})^{1/2}_{req} \quad (10.24)$$

Чтобы получить заданное разрешение двух хроматографических пиков R_s для выбранных хроматографической системы и фаз (отношение элюирования $r_{1,2}$), необходима колонка с определенным числом эффективных тарелок $(n_{ef})_{req}$. Из данных, приведенных в табл. 10.1, ясно видно, что при небольшом увеличении $r_{1,2}$ в области, близкой к 1,00, резко уменьшается число теоретических тарелок, необходимых для разделения. Следователь-

Таблица 10.1

Зависимость требуемого числа эффективных теоретических тарелок n_{ef} от относительного удерживания $r_{1,2}$ для различных значений разрешения $R_{1,2}$

$r_{1,2}$	n_{ef}		
	$R_{1,2}=1$	$R_{1,2}=1,5$	$R_{1,2}=2$
1,001	$16 \cdot 10^6$	$36 \cdot 10^6$	$64 \cdot 10^6$
1,01	$16 \cdot 10^4$	$36 \cdot 10^4$	$64 \cdot 10^4$
1,05	6944	15 625	27 777
1,10	1932	4 347	7 728
1,15	932	2 098	3 729
1,2	574	1 291	2 294
1,3	299	675	1 199

но, чем выше селективность разделения, тем ниже необходимая эффективность хроматографической колонки.

Теории, основанные на концепции теоретических тарелок, предполагают, что все протекающие в колонке процессы могут рассматриваться как взаимно независимые. Это предположение чаще всего справедливо, если скорость результирующего процесса определяет один из процессов. Однако обычно протекающие в колонке процессы влияют друг на друга, и это отражено в уравнении, выведенном для определения высоты, эквивалентной теоретической тарелке. Хотя Гиддингс [25] показал, что в некоторых случаях необходимо включать члены, характеризующие влияние вихревой диффузии и массопереноса в газовой фазе в один член уравнения, Вичар и Новак [89] показали зависимость массопереноса в жидкой фазе от массопереноса в газовой фазе. В качестве примера мы приведем уравнение Гиддингса [25], которым следует пользоваться при высоких скоростях потока газа-носителя:

$$H = 1/[(1/A) + (1/C_g\bar{u})] + B/\bar{u} + C_L u. \qquad (10.25)$$

10.2. ПРИБОРЫ

Конструкция установки для газовой хроматографии в принципе относительно проста, и вне зависимости от типа хроматографической системы (газо-жидкостная или газо-адсорбционная) в нее обычно входят одни и те же приборы. Схема такой установки показана на рис. 10.5; она состоит из источника газа-носителя, регулятора потока и расходомера, устройства

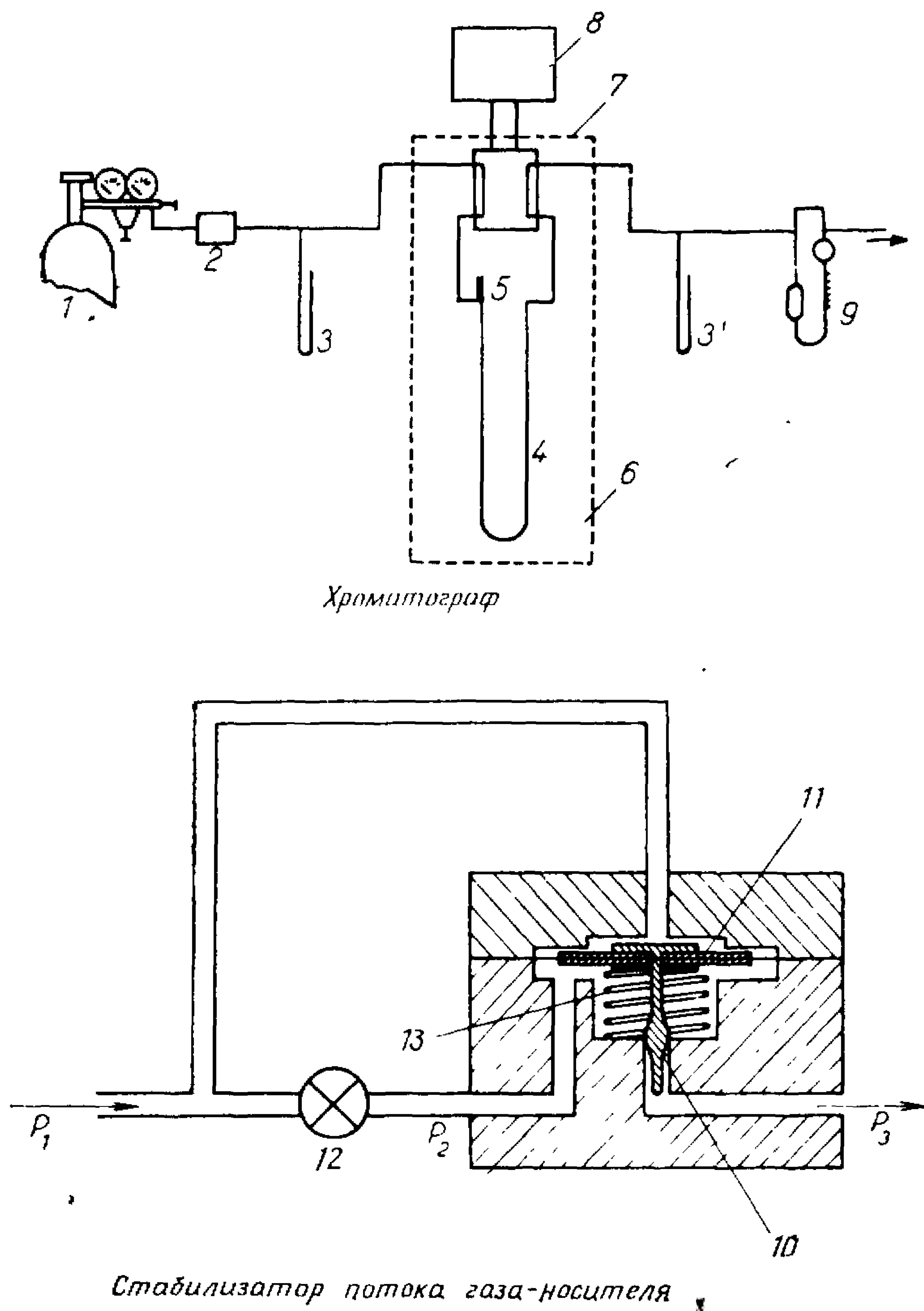


Рис. 10.5. Схема установки для газовой хроматографии.

Газовый хроматограф: *1* — баллон высокого давления с газом-носителем; *2* — стабилизатор потока; *3*, *3'* — манометры; *4* — хроматографическая колонка; *5* — устройство для ввода пробы; *6* — термостат; *7* — детектор; *8* — самописец; *9* — расходомер. Стабилизатор потока газа-носителя: *10* — перекрывающий конус; *11* — мембрана; *12* — игловой кран; *13* — пружина. P_1, P_2, P_3 — давление газа.

для ввода образца, хроматографической колонки, детектора, самописца и термостата.

Газ-носитель проходит через регулирующий кран, осушительные трубки и еще один кран, предназначенный для тонкого контроля потока, поступающего в хроматографическую колонку. Колонка представляет собой трубку, заполненную соответствующим хроматографическим материалом. Вблизи от вво-

да газа в колонку расположено устройство для ввода пробы. Анализируемая смесь разделяется в колонке, и в идеальном случае ее компоненты раздельно перемещаются потоком газа-носителя и элюируются из колонки поочередно. Перепад давления в колонке измеряется манометрами, расположенными до и после колонки. Выходящий из колонки газ поступает в детектор. Скорость газа-носителя измеряется расходомером, который обычно располагается на выходе из установки. Температура колонки и некоторых детекторов поддерживается строго в заданном интервале с помощью термостатов. Если температура кипения анализируемых соединений превышает 60—70 °С, в колонке необходимо поддерживать несколько более высокую температуру; если же исследуются соединения с более низкой температурой кипения, то колонку в некоторых случаях следует охлаждать. Сигналы детектора регистрируются самописцем.

10.2.1. ГАЗ-НОСИТЕЛЬ

Газы, выполняющие роль подвижной фазы, выбирают в зависимости от типа используемого детектора. Они должны быть инертны по отношению и к упаковочному материалу в колонке, и к исследуемым соединениям. Газы-носители обычно хранятся в баллонах под давлением. Рекомендуется проводить дополнительную очистку газа-носителя, пропуская его через трубки, заполненные молекулярным ситом; причем иногда эти трубки помещают в охлаждающую баню. Для правильной работы необходимо, чтобы газ-носитель проходил через колонку и детектор с постоянной скоростью. Для этого используют маностат, иногда совместно со стабилизатором скорости, схема которого приведена на рис. 10.5. Для рутинных анализов допустимы отклонения в пределах $\pm 1\%$.

В качестве подвижной фазы обычно используются следующие газы: очищенный от кислорода азот (преимущества — низкая стоимость, простая очистка, безопасность в работе, относительно высокая молекулярная масса; недостаток — низкая теплопроводность); электролитический водород (преимущества — высокая теплопроводность, низкая вязкость и, следовательно, малый перепад давления в колонке, низкая стоимость; недостатки — значительная диффузия разделяемых компонентов, опасность взрыва при течи); гелий (преимущества — те же, что и у азота и водорода; недостаток — высокая цена); аргон (важен для ионизационных детекторов с постоянным источником ионизации; преимущества — относительно низкая цена, простая очистка).

10.2.2. ВВОД ОБРАЗЦА

Образец вводится в колонку вблизи от места входа газа-носителя. Метод ввода пробы зависит от ее агрегатного состояния. Общие условия ввода образца в колонку: образец, испаренный в небольшом объеме, должен быть немедленно перене-

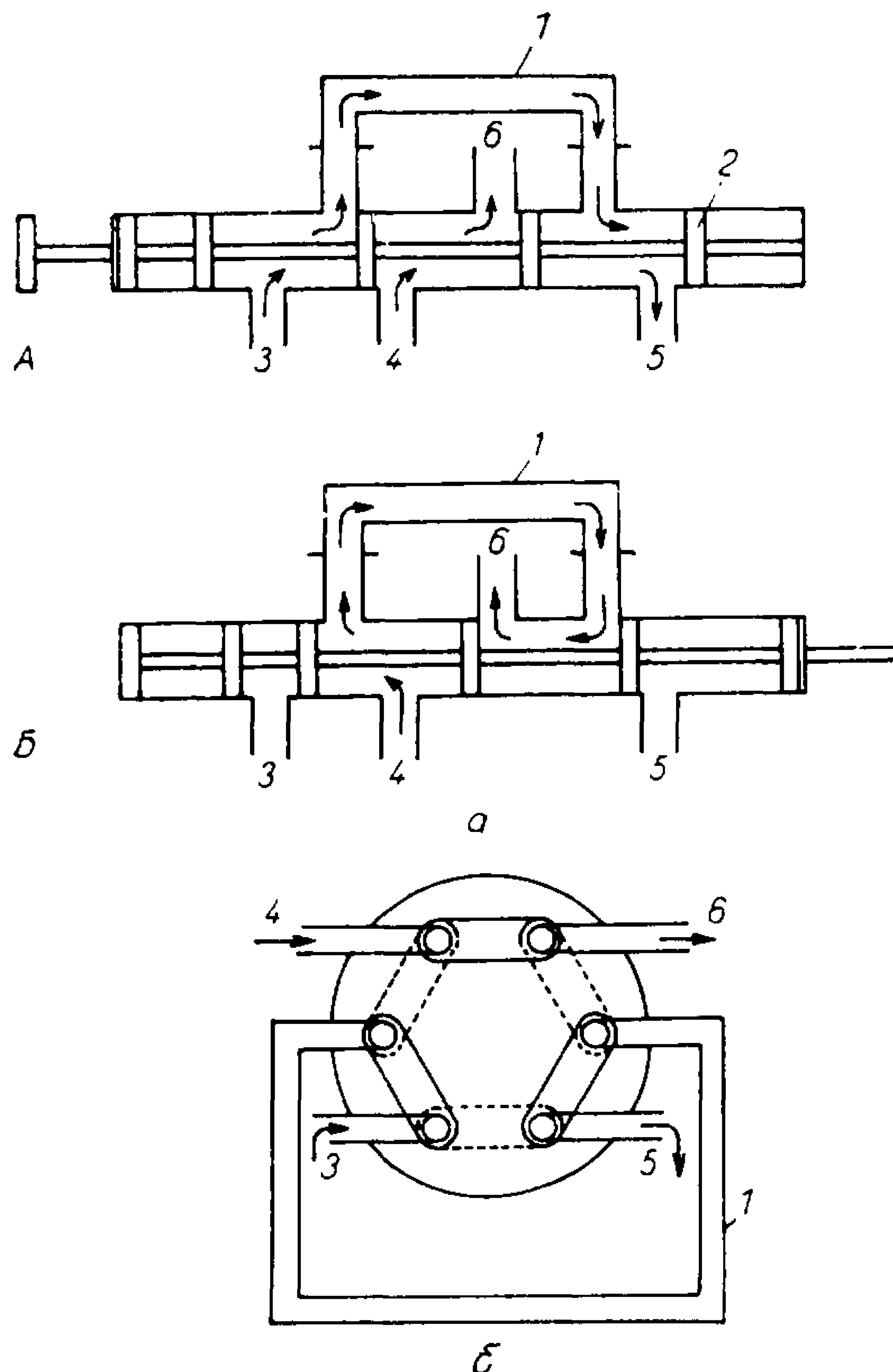


Рис. 10.6. Схема дозирующего крана (*а*) [59а] и вращающегося дозирующего крана (*б*) для ввода газообразной пробы.

А — нормальное положение крана; *Б* — положение крана при вводе пробы; *1* — калиброванная петля для образца; *2* — перекрывающее кольцо; *3* — ввод образца; *4* — ввод газа-носителя; *5* — вывод газа-носителя; *6* — ввод в колонку.

сен в начало колонки; в момент ввода образца равновесие в колонке не должно нарушаться, количество образца и вся методика должны быть легко воспроизводимы. Поскольку эффективность разделения на колонке достаточно высока, количество образца должно быть минимально возможным: обычно 0,001—1 мл газообразного образца и не более нескольких микролитров

или миллиграммов жидкого или твердого образца соответственно.

Газообразные образцы обычно вводятся с помощью обводной пипетки или в простейшем случае с помощью системы из двух запорных кранов, между которыми имеется пространство известного объема; однако в последнее время применяются краны различных систем с переменным объемом вводимой пробы. Схемы двух таких устройств показаны на рис. 10.6. Воспроизводимость ввода при использовании таких систем $<0,5\%$. Жидкие образцы чаще всего вводят микрошприцами через резиновую прокладку (септум) в специальное нагреваемое устройство, и из него образец поступает собственно в колонку. Микрошприцы такого типа выпускаются рядом фирм; воспроизводимость ввода пробы этим методом около 2%. Твердые образцы и образцы с высокой концентрацией растворенного соединения удобнее всего вводить в виде растворов в летучих растворителях. В соответствии с одной из методик точно отмеренные жидкие или твердые образцы вводят в колонку в запаянных стеклянных капиллярах, которые затем разбиваются.

Полный объем образца, поступающего в капиллярную колонку, расщепляется Т-образной трубкой в соотношении от 1 : 100 до 1 : 1000. В поток газа-носителя вводится несколько микролитров образца, а в колонку попадает только часть смеси (объем которой зависит от соотношения площадей сечения трубки с газом-носителем и колонки), большая же часть образца выбрасывается в атмосферу. Выпускаемые фирмами приборы, разработанные для стандартных анализов, часто снабжаются автоматическими дозаторами проб.

10.2.3. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ КОЛОНКИ

Хроматографическая колонка — «сердце» хроматографа, в ней и происходит собственно разделение смеси. Конструкция колонок относительно проста, и их можно изготовить в большинстве лабораторий. Колонки подразделяются на упаковочные и капиллярные. Изготавливают их из стеклянных, стальных, полиэтиленовых, тефлоновых и иногда медных трубок.

Стеклянные колонки легко сделать; кроме того, они удобны тем, что качество их заполнения легко можно проверить. Однако их трудно подсоединить к металлическим частям хроматографа при работе при повышенных температурах. Тефлоновые колонки используются в особых случаях, когда не пригодны ни стекло, ни нержавеющая сталь, например при анализе некоторых органических серусодержащих соединений и др. Применять медные колонки не рекомендуется, поскольку, как выяснилось, они могут действовать как катализаторы и на неподвиж-

ную фазу, и на разделяемые компоненты, особенно при повышенных температурах. Форма колонок выбирается в соответствии с их размером и размерами термостата. Колонки могут быть прямыми, U-образными или спиральными. Диаметр спирали должен быть по крайней мере в 20 раз больше диаметра колонки. Внутренний диаметр аналитической колонки обычно составляет 3—6 мм, а ее длина — от 30 до 3 м, но нередко используются и более длинные колонки. В газо-адсорбционной хроматографии применяют более короткие колонки, чем в газо-жидкостной. Диаметр* капиллярных колонок, как правило, равен 0,1—0,3 мм, а длина 50—100 м и более.

10.2.4. ТЕРМОСТАТ

Подвижность разделяемых компонентов в колонке в большой степени зависит от температуры, поэтому, чтобы элюирование длилось приемлемое время, в колонке необходимо поддерживать выбранную температуру. Область рабочих температур чрезвычайно обширна — от температуры жидкого азота и до 400 °С и более в соответствии с природой хроматографируемых соединений и конструкцией прибора. Выбранная температура должна поддерживаться постоянной в очень узком интервале (±0,1 °С). Современные термостаты вполне позволяют поддерживать температуру с такой степенью точности. Хроматографические термостаты снабжены воздушным нагревателем и вентилятором. Преимущество таких термостатов — их чувствительность при работе при высоких температурах.

10.2.5. ДЕТЕКТОРЫ

Хроматографический детектор — это прибор, преобразующий результаты разделения в форму, удобную для регистрации самописцем. В соответствии со старой классификацией детекторы разделяются на интегральные и дифференциальные. Интегральный детектор измеряет суммарное количество соединений, выделяющееся в процессе анализа, отклик его пропорционален полному количеству вещества, прошедшего через детектор. С помощью этого детектора получают интегральную кривую ступенчатой формы, показанную на рис. 10.7. Дифференциальный детектор дает непосредственный отклик на компонент, который проходит через детектор. Дифференциальная хроматограмма состоит из пиков, похожих на гауссовы кривые

* В последнее время в хроматографической практике активно используются гибкие кварцевые капиллярные колонки, внутренняя поверхность которых более инертна по сравнению со стеклянными. Хороший обзор по кварцевым колонкам написан В. Дженнингсом [*Jennings W.*, Journal High Resolution Chromatography, v. 3, № 12, 601 (1980)].

(рис. 10.2). Хроматограммы обоих типов можно обработать качественно и количественно. В интегральных хроматограммах мерой количества компонента служит высота одного шага кривой, в дифференциальных — площадь под кривой элюирования (ограниченная нулевой линией), и высота, и площадь пропорциональны количеству компонента.

Детекторы также классифицируют в соответствии с их чувствительностью к концентрации или (и) массе. Концентрационные детекторы дают немедленный отклик, интенсивность ко-

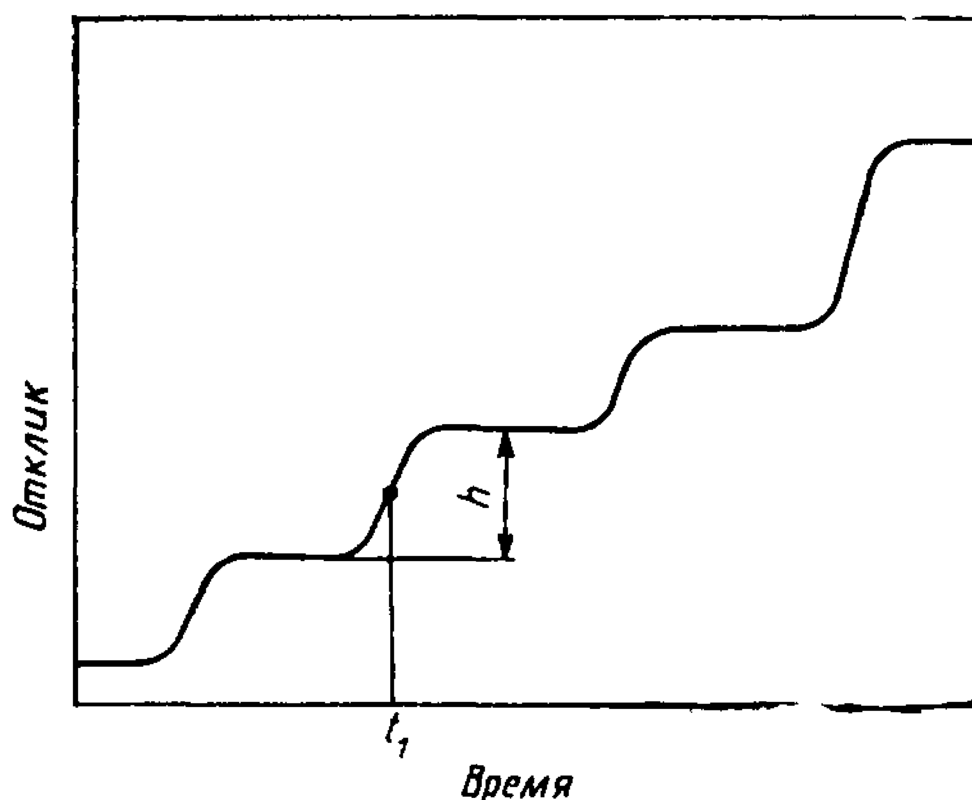


Рис. 10.7. Пример интегральной хроматограммы.

t_1 — время удерживания; h — высота шага.

торого пропорциональна концентрации компонента в газе-носителе. Площадь под пиком обратно пропорциональна объему газа-носителя, элюированного вместе с образцом, поэтому скорость потока должна быть постоянной. В детекторах, чувствительных к массе, сигнал пропорционален массе компонента, прошедшего через детектор за единицу времени, и не зависит от концентрации компонента в газе-носителе. Площадь пика не зависит от скорости потока, и поэтому постоянство скорости потока газа-носителя не столь важно.

Поскольку принцип действия хроматографических детекторов может быть самым разным, детекторы трудно сравнивать. Однако существуют несколько общих критериев. Это селективность, чувствительность, реакция, шум, нижний предел детектирования (наименьшее детектируемое количество) и линейность отклика. Последняя характеристика зависит от принципа работы детектора. Для количественной работы почти каждый детектор требует калибровки, необходимой для определения поправочных коэффициентов.

Чувствительность детектора обычно определяется соотноше-

ниями, представленными Димбатом и сотр. [14]; эти соотношения установлены очень давно, но до сих пор используются. Чувствительность концентрационных детекторов определяется как отклик детектора (обычно в милливольтах) в расчете на единицу концентрации:

$$s = (\text{мВ} \cdot \text{см}^3)/\text{мг}. \qquad (10.26)$$

Параметры, определяющие чувствительность (s), легко измерить.

$$s = AC_1C_2C_3/w, \qquad (10.27)$$

где A — площадь под кривой элюирования, см^2; C_1 — чувствительность самописца, мВ/см; C_2 — величина, обратная скорости протяжки ленты, мин/см; C_3 — объемная скорость потока газа-носителя, см^3/мин, и w — масса компонента, мг.

Для массового детектора соотношение Димбата имеет несколько иной вид:

$$s' = \text{мВ}/(\text{мг}/\text{с}) = (\text{мВ} \cdot \text{с})/\text{мг} \qquad (10.28)$$

Чувствительность детектора этого типа (s') определяется так же, как и чувствительность концентрационного детектора

$$s' = AC_1C_2/w, \qquad (10.29)$$

где A — площадь под кривой элюирования, см^2; C_1 — чувствительность самописца, мВ/см; C_2 — величина, обратная скорости протяжки ленты самописца, с/см; w — масса компонента, мг. Из приведенных выражений следует, что s' в отличие от s не зависит от скорости потока.

Отклик детектора определяется величиной сигнала, вызываемого определенным количеством образца. Его рассчитывают как отношение площади пика к массе образца. Например, для ионизационного детектора

$$\text{Отклик} = \frac{{}^1/_2\,(s) \cdot \text{Высота пика}\ (A)}{\text{Масса}} = \text{Кл.г} \qquad (10.30)$$

Сигнал детектора в принципе можно усилить до любого значения, но при этом также усиливаются шумы, и если аналитический сигнал очень мал, то он может потеряться в шуме нулевой линии, тем не менее большое усиление используется. Однако уровень шума ограничивает концентрацию или массу, которая может быть продетектирована (см. рис. 10.8).

Из рисунка следует, что компонент должен давать отклик детектора выше, чем N, для того чтобы он отличался от шума нулевой линии. Наименьший предел чувствительности (или наименьшее детектируемое количество вещества) обычно определяется как концентрация (или количество) вещества, которое дает сигнал в два раза больший, чем уровень шума.

Точность количественного анализа зависит от линейного соотношения между концентрацией или массой и откликом детектора. Линейная область отклика определяется как пропорциональность отклика детектора величине образца на двойной ло-

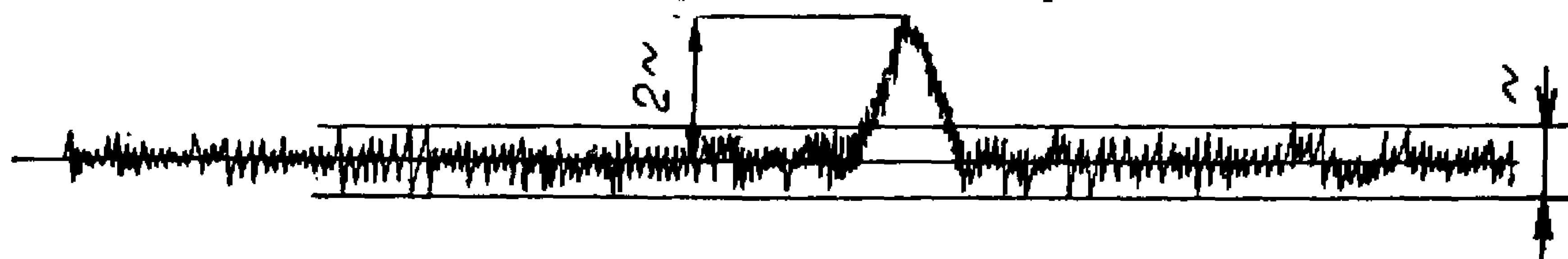


Рис. 10.8. Шум детектора и наименьшее детектируемое количество соединения.
N — уровень шума; $2N$ — наименьшее детектируемое количество соединения.

гарифмической шкале. Эту область можно определить как отношение наибольшей концентрации (количества) вещества к наименьшей, в пределах которой сохраняется линейная зависимость. На рис. 10.9 приведены оба случая. Точка *б* указывает

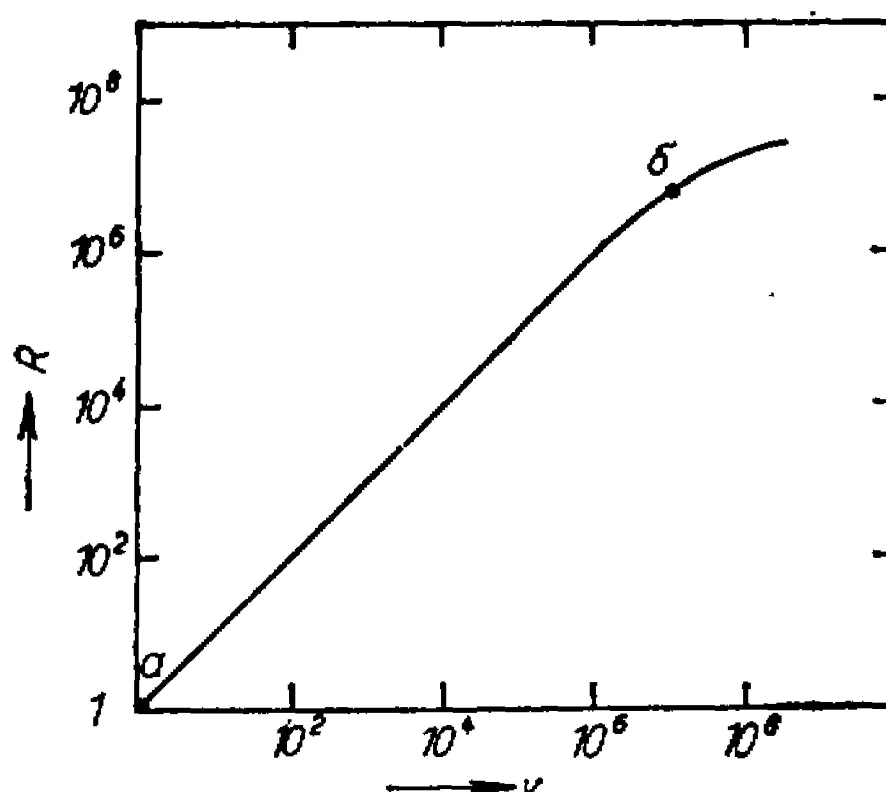


Рис. 10.9. Логарифмическая зависимость линейности отклика детектора (R) от количества образца (v).
а—б — линейная область.

максимальную массу линейной области (область $1:10^7$). Другими словами, эту калибровочную кривую можно использовать для изменения концентрации на 10 порядков.

ДЕТЕКТОР ПО ТЕПЛОПРОВОДНОСТИ (КАТАРОМЕТР)

Катарометр впервые был использован в газовой хроматографии Классоном [10]. Принцип действия этого детектора состоит в следующем: количество тепла, которое нагретые тела отдают окружающей газовой среде, зависит от состава послед-

ней. Поэтому зная, какое количество тепла отдано, можно судить о составе газовой среды. Катарометр относится к числу детекторов, наиболее широко применяемых в газовой хроматографии. На рис. 10.10 приведена схема катарометра. В цилиндрическую полость металлического блока помещена маленькая металлическая спираль. Через спираль проходит постоянный

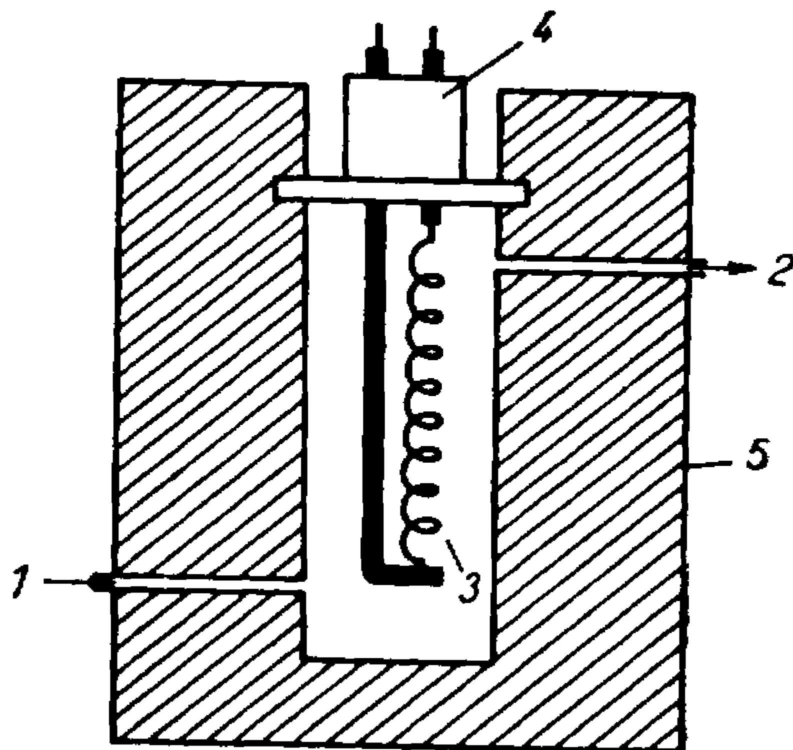


Рис. 10.10. Схема катарометра [37а].

1 — ввод газа из колонки; 2 — выход в атмосферу; 3 — нить сопротивления; 4 — изолятор; 5 — металлический блок.

ток, в результате чего она нагревается. Если спираль омывает чистый газ-носитель, при постоянной скорости потока спираль теряет постоянное количество тепла, и после достижения равновесия температура спирали становится постоянной. Однако, если состав газа меняется, например при появлении зоны элюируемого вещества, температура спирали также меняется, что вызывает соответствующее изменение электрического сопротивления. Это изменение затем измеряется мостом Уитстона. Обычно спирали изготавливают из металлов с высоким термическим коэффициентом сопротивления, стойких к химической коррозии. Как правило, используются платина, вольфрам и их сплавы, а также никель. В некоторых детекторах металлические нити заменены на термисторы, чувствительность которых очень высока. Однако использовать термисторы можно только при низких температурах, так как при повышенных температурах их стабильность мала.

Изменение сопротивления нити катарометра измеряется и переводится в выходной сигнал. На рис. 10.11 показано простое подключение моста Уитстона. Если у всех четырех нитей, C_1, C_2, R_1 и R_2, одинаковая температура и, следовательно, одинаковое сопротивление, то мост находится в равновесии. Однако,

когда сопротивление нитей C_1 и C_2 меняется вследствие изменения состава проходящего газа, равновесие нарушается и генерируется выходной сигнал. Большинство детекторов имеют две

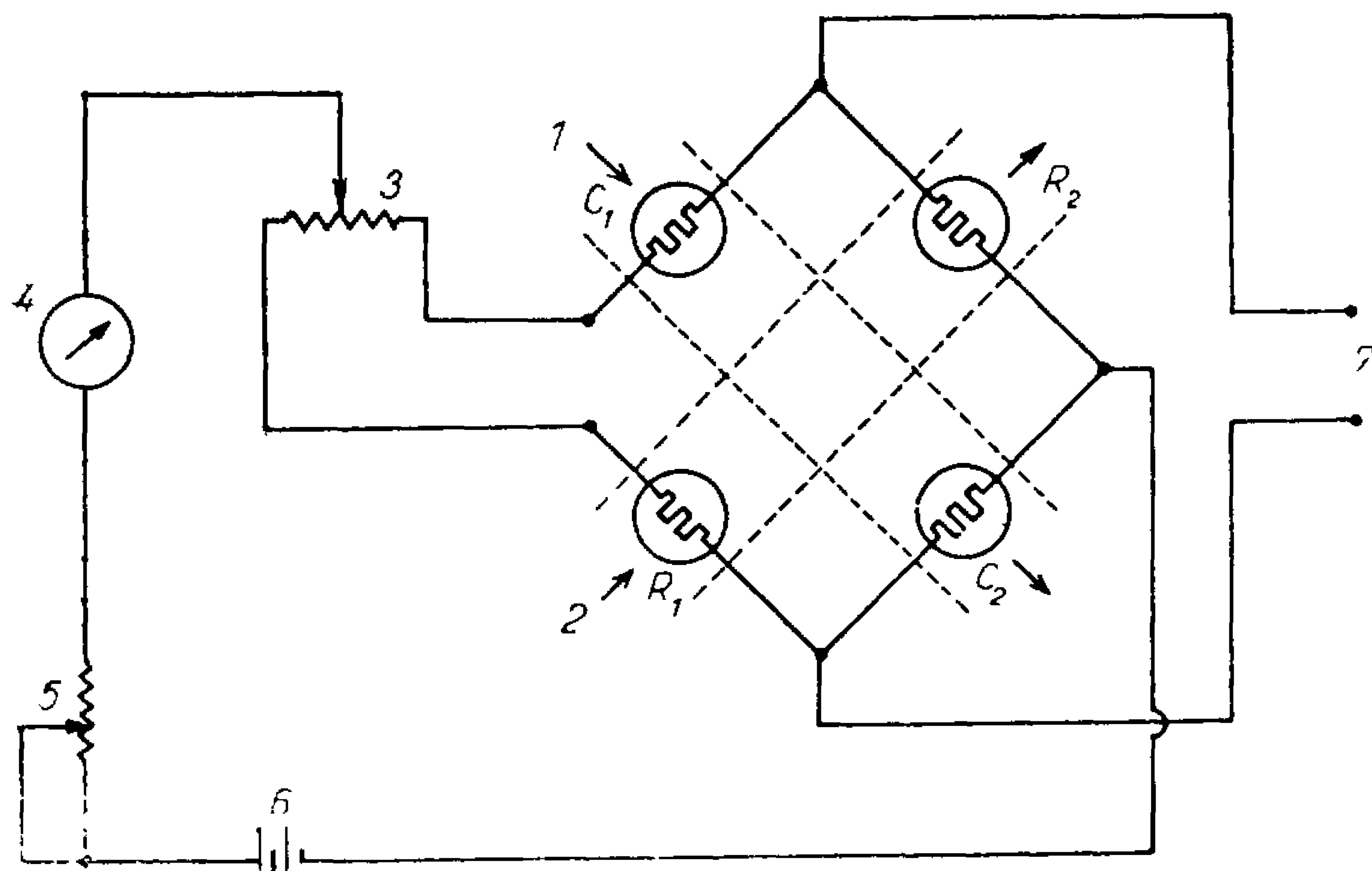


Рис. 10.11. Схема моста Уитстона [59а].

C_1, C_2 — измерительные ячейки; R_1, R_2 — сравнительные ячейки; *1* — вход газа из колонки; *2* — ввод чистого газа-носителя; *3* — установка нуля; *4* — миллиамперметр; *5* — регулятор тока, проходящего через нити; *6* — источник тока; *7* — вывод на самописец.

пары равных нитей: C_1—R_1, C_2—R_2 (рис. 10.11). Сравнительный поток газа-носителя омывает нити R_1 и R_2, тогда как газ, поступающий из колонки, омывает нити C_1 и C_2. Такое устройство

Таблица 10.2

Теплопроводность некоторых газов и паров, отнесенная к теплопроводности воздуха

Газ	$\lambda_i/\lambda_{возд}$		Газ	$\lambda_i/\lambda_{возд}$	
	0°C	100°C		0°C	100°C
Воздух	1,000	—	Ксенон	0,21	—
Водород	7,000	8,94	Аммиак	0,88	1,08
HD	5,87	—	Вода (пары)	—	0,77
Дейтерий	5,08	—	Этан	0,75	1,06
Гелий	5,87	—	Изопентан	0,51	0,69
Азот	1,00	0,99	Бензол	0,37	0,56
Кислород	1,01	1,03	Диоксид углерода	0,59	0,68
Неон	1,92	1,88	Метанол	0,58	0,70
Аргон	0,68	0,68	Этанол	0,57	0,68

увеличивает интенсивность сигнала и улучшает стабильность моста по отношению к изменениям температуры среды. Все четыре канала заключены в один металлический блок с высокой теплоемкостью.

На чувствительность катарометра влияют два основных фактора. Во-первых, увеличение тока моста вызывает резкое усиление выходного сигнала; однако чрезмерное увеличение тока вызывает нестабильность нулевой линии и даже перегорание нити. Во-вторых, используемый газ-носитель должен обладать максимально возможной теплопроводностью. Наилучшие газы-носители — водород и гелий, так как они позволяют получить высокую чувствительность. В табл. 10.2 приведены теплопроводности некоторых газов и паров, отнесенные к теплопроводности воздуха.

ВЕСЫ МАРТИНА

Весы Мартина — детектор, в котором измеряется плотность газа. Этот детектор удобно использовать в газовом хроматографе по ряду причин. Так, например, в этом детекторе образец не соприкасается с нагреваемыми элементами (что позволяет анализировать коррозионно-активные вещества), в качестве газов-

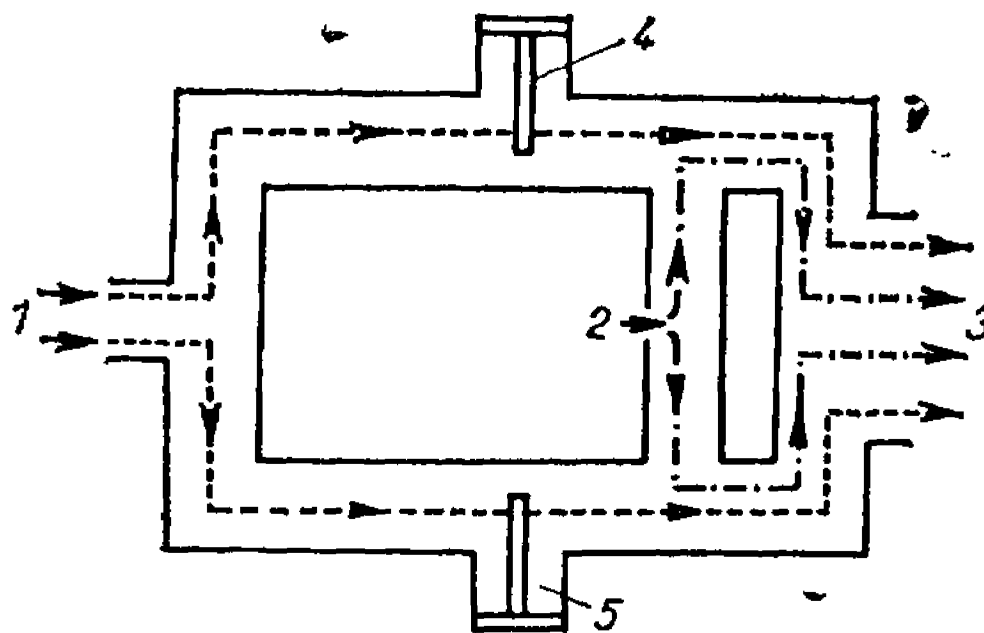


Рис. 10.12. Схема весов Мартина [59а].

1 — ввод газа-носителя; *2* — ввод газа из колонки; *3* — вывод газа в атмосферу; *4*, *5* — сопротивления.

носителей могут использоваться легкодоступные газы (N_2, Ar, CO_2), и, наконец, при таком способе детектирования образец не разрушается. Упрощенная модель весов Мартина (разработанная фирмой Gow-Mac Instrument Inc.) схематически показана на рис. 10.12. Чистый газ-носитель поступает в детектор через вход *1*, а газ из колонки — через вход *2* и выходят из детектора через выход *3*. Элементы *4* и *5*, измеряющие сопротивление, расположены в потоке чистого газа и соединены с мостом Уит-

стона. Если у газа, выходящего из колонки, та же плотность, что и у чистого газа, то оба плеча находятся в равновесии. Однако, если плотность газа, поступающего из колонки, выше, чем у газа-носителя, то газ с большей плотностью пойдет по нижней ветви, и в результате поток чистого газа в ветви *1*—*5* уменьшится, а это нарушит равновесие моста Уитстона. Чувствительность детектора зависит от разности плотностей газа-носителя и анализируемого компонента. Водород и гелий не вполне пригодны для использования в качестве газов-носителей.

ИОНИЗАЦИОННЫЕ ДЕТЕКТОРЫ

В работе ионизационных детекторов используется пропорциональность электропроводности газа концентрации заряженных частиц, присутствующих в газе. На рис. 10.13 приведена схема ионизационного детектора (ионизатор на схеме не показан).

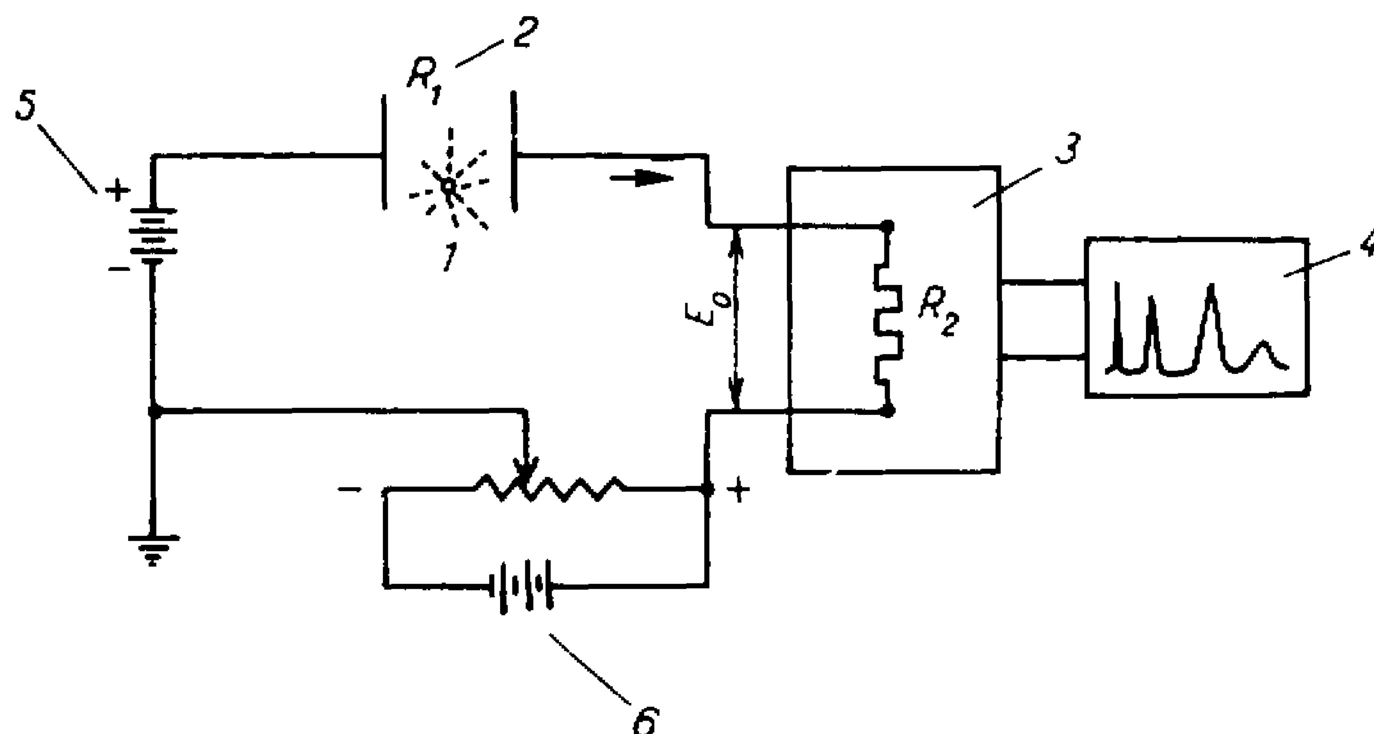


Рис. 10.13. Схема ионизационного детектора [59а].

1 — источник ионизации; *2* — область между электродами; *3* — электрометр; *4* — самописец; *5* — источник напряжения ионизации; *6* — источник компенсационного потенциала; E_0 — измеряемое напряжение; R_1 — электрическое сопротивление среды; R_2 — измеряемое сопротивление.

Поступающие из колонки газы проходят через ионизатор, в котором часть молекул ионизуется, а затем проходят между электродами. В присутствии заряженных частиц между электродами возникает ток *I*. Изменение напряжения на R_1 вызовет изменение напряжения и на R_2. Это изменение напряжения усиливается электрометром и регистрируется самописцем. Пространство между электродами можно рассматривать как сопротивление, величина которого зависит от числа заряженных частиц. Если через детектор проходит чистый газ-носитель, то концентрация заряженных частиц постоянна и ток, проходящий через R_1, также постоянен. Однако, если через детектор проходит ка-

кая-то часть исследуемого соединения, концентрация заряженных частиц увеличивается, что вызывает усиление тока и соответственно усиление сигнала, который регистрируется в виде хроматографического пика.

ПЛАМЕННО-ИОНИЗАЦИОННЫЙ ДЕТЕКТОР

Этот детектор подробно описан в статье Стернберга и сотр. [82]. Схема его представлена на рис. 10.14. Выходящий из колонки газ смешивается с водородом и проходит в форсунку горелки детектора. Образующиеся в пламени ионизованные частицы заполняют пространство между электродами, в результате сопротивление снижается, а ток при этом усиливается. Пламенно-ионизационный детектор реагирует практически на

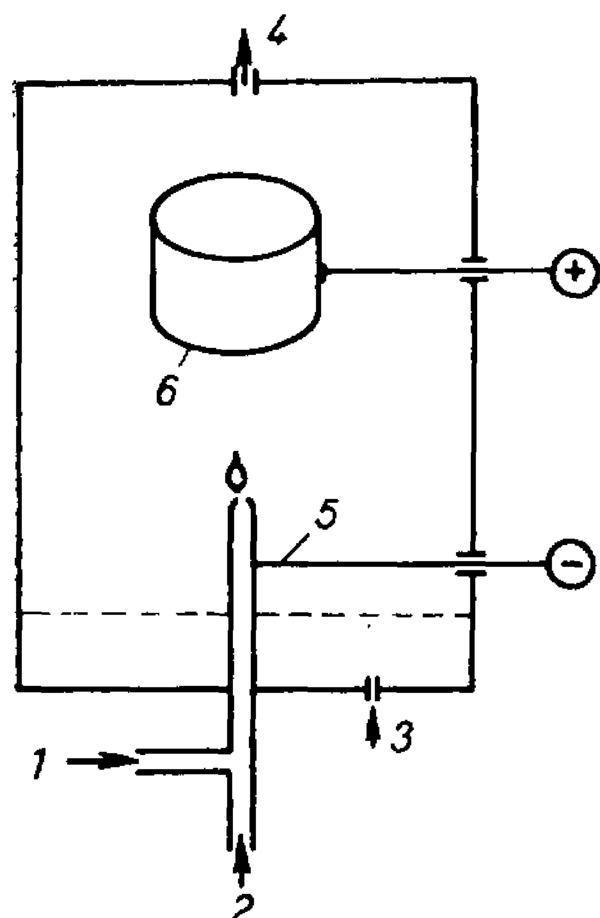


Рис. 10.14. Схема пламенно-ионизационного детектора [37a].

1 — ввод водорода; 2 — ввод газа из колонки; 3 — ввод воздуха; 4 — вывод в атмосферу; 5 — катод; 6 — собирающий электрод.

Таблица 10.3

Список соединений, при детектировании которых пламенно-ионизационным детектором наблюдается очень слабый отклик или вообще отклик не наблюдается

H_2	CS_2	CO
He	COS	CO_2
Ar	H_2S	H_2O
Kr	SO_2	$SiCl_4$
Ne	NO	$SiHCl_3$
Xe	N_2O	SiF_4
O_2	NO_2	HCOH
N_2	NH_3	HCOOH

все соединения, за исключением указанных в табл. 10.3. Качество работы этого детектора зависит от подходящего выбора потока всех используемых газов. Обычно наилучшая чувствительность и стабильность достигаются при скорости потока газа-носителя 30—50 мл/мин, водорода примерно 30 мл/мин и воздуха 300—500 мл/мин [35]. Пламенно-ионизационный детектор имеет наибольшую область линейного отклика, распространяющуюся на 6—7 порядков (рис. 10.9). Благодаря этой особенности, а также высокой чувствительности пламенно-ионизационный детектор наиболее пригоден для анализа следов.

ГЕЛИЕВЫЙ ДЕТЕКТОР

Этот детектор (рис. 10.15) был разработан для ультрамикроанализа постоянных газов [80]. Под воздействием тритиевого источника β-излучения и высокого градиента электрического поля (более 2000 В/см) гелий, используемый в качестве газа-

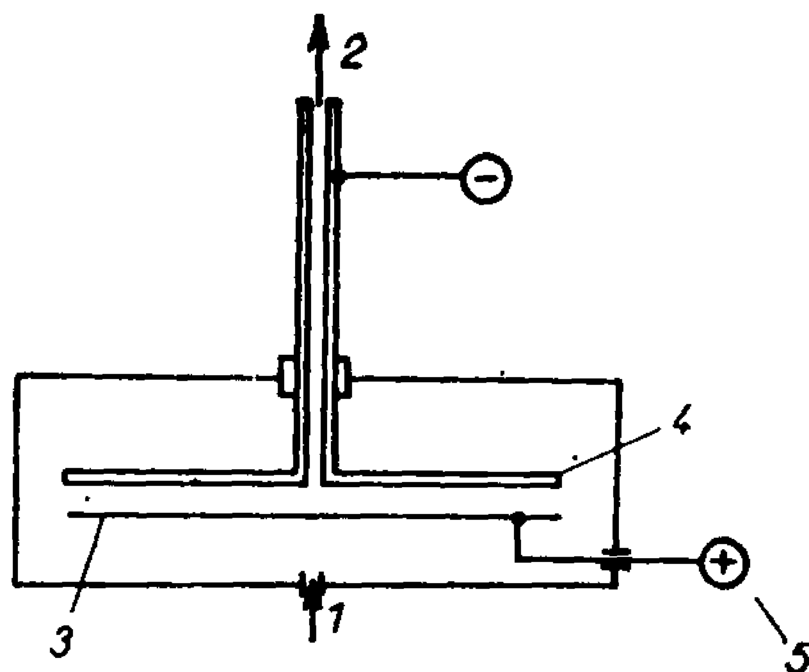


Рис. 10.15. Схема гелиевого детектора [37а].

1 — ввод газа из колонки; *2* — вывод в атмосферу; *3* — источник излучения; *4*, *5* — электроды.

носителя, переходит в метастабильное состояние с определенным ионизационным потенциалом. Все соединения с более низким потенциалом ионизации при этом ионизуются и дают положительный сигнал. Гелиевый детектор дает отклик на все газы, исключая неон. Этот детектор особенно удобен для анализа следовых примесей в очень чистых этилене, кислороде, аргоне, водороде, диоксиде углерода и т. д., однако используемый гелий должен быть очень чистым, иначе из-за присутствующих в нем примесей нулевой ток окажется слишком высоким.

Помимо описанных выше основных типов детекторов, имеется ряд детекторов специального назначения. Это, например, пламенно-эмиссионные детекторы, масс-спектрометрические, каталитические детекторы, в которых измеряются диэлектрическая проницаемость, поглощение света как в УФ-, так и в ИК-областях, и т. д. Они применяются главным образом как селективные детекторы (разд. 10.4.3 и 10.4.4).

10.2.6. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ САМОПИСЦЫ

Изменение состава газа, поступающего из колонки, с помощью детектора трансформируется в изменение некоторого электрического параметра, как правило, напряжения. Изменение этого параметра во времени регистрируется, и полученную хроматограмму можно обрабатывать как качественно, так и количественно. Регистрируют хроматограммы самопишущие потенциометры, которые дают длительную запись отклика детектора как функции времени. В настоящее время выпускается много типов самописцев. Однако в газовой хроматографии можно применять лишь те самописцы, которые отвечают определенным требованиям: это высокая скорость регистрации (примерно одна секунда на всю шкалу отклонения); воспроизводимое отклонение пера при подаче одного и того же напряжения; линейная зависимость по всей шкале; высокая чувствительность, т. е. отклонение пера при очень маленьком изменении потенциала. Самописцы с широким выбором скорости перемещения ленты, контролем чувствительности, установкой нуля улучшают характеристики всей установки. Для лабораторных работ рекомендуется планшетный самописец, тогда как в промышленных условиях целесообразно пользоваться полностью закрытым прибором.

Основной недостаток самописцев — ограниченная линейная область, меньшая, чем у основных детекторов, применяемых в газовой хроматографии. Самописцы могут регистрировать концентрации, величины которых лежат в пределах двух порядков, тогда как линейная область отклика пламенно-ионизационного детектора втрое больше. Именно по этой причине такое большое внимание уделялось разработке методов регистрации сигналов детекторов без применения переключения диапазонов. К приборам такого типа относятся, в частности, цифровые интеграторы.

10.3. ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ПОДГОТОВКА

10.3.1. НЕПОДВИЖНАЯ ФАЗА

Каких-либо объективных методов выбора жидкой неподвижной фазы для разделения данной смеси не существует. Неподвижную фазу выбирают главным образом, основываясь на собственном опыте. Тем не менее приведем несколько рекомендаций. Неподвижная фаза должна хорошо растворять отдельные компоненты образца, причем растворимости отдельных компонентов должны различаться. Неподвижная фаза должна быть практически нелетучей при рабочей температуре (0,01—0,1 мм рт. ст.), термостойкой (стабильность может ухудшаться из-за

Таблица 10.4

Перечень наиболее часто используемых неподвижных фаз

Фаза	Максимальная температура, °C	Полярность[а]	Растворитель[б]
Адипонитрил	50	п.п.	4,5
Амин 220	180	п.	4,5
Апиезон			
L	300	н.	4,5
M	275	»	4,5
N	300	»	4,5
W			
Бентон 34	200	с.	5
7,8-Бензохинолин	150	п.п.	4,5
Бис(2-этоксиэтил)адипинат	150	»	5
Бис(2-этоксиэтил)тетрахлорфталат	150	»	4,5
Бутандиоладипинат	225	»	4,5
Бутандиолсукцинат	225	»	4,5
Карбовакс			
20M	250	п.	4,5
20M TPA	250	»	5,7
400	125	»	4,5
400 моноолеат	125	»	4,5
600 моностеарат	125	»	4,5 (нагр.)
750	150	»	4,5
1000	175	»	4,5
1500	200	»	4,5
4000	200	»	4,5
4000 TPA	175	»	5,6
4000 моностеарат	220	»	5
6000	200	»	4,5
Касторвакс	200	»	4,5
Дибутилфталат	100	п.п.	4,5
Дибутилтетрахлорфталат	150	п.	5
Диэтиленгликоля			
адипинат	190	»	4,5
глутарат	225	»	4
себакат	190	»	4,5 (нагр.)
сукцинат	190	»	1,5

Фаза	Максимальная температура, °С	Полярность[а]	Растворитель[б]
Диглицерол	120	в.	7,9
Диизодецилфталат	175	п.п.	4,5
Диизодецилсебакат	175	»	4,5
2,4-Диметилсульфолан	50	п.	4,5
Динонилфталат	175	п.п.	4,5
Динонилсебакат	125	»	4
Диоктилфталат	175	»	4,5
Диоктилсебакат	100	»	4,5
Этиленгликоля			
адипинат	200	п.	4,5 (нагр.)
глутарат	225	»	4
себакат	200	»	4,5 (нагр.)
сукцинат	200	»	4,5 (нагр.)
тетрахлорфталат	225	»	4
Фенилдиэтаноламиносукциниат	225	»	1,5
FFAP	275	»	5
Глицерол	100	в.	7,9
Халькомид М-18	150	п.п.	4,5
Гексаметилфосфорамид	50	п.	4,5
Гипроза SP-80	190	»	4,5 (нагр.)
Игепал	200	п.п.	4,5 (нагр.)
Кель F греаза	200	»	4,5
Кель F ойл 10	100	»	4,5
Маннит	200	в.	7,9
Неопентилгликоля			
адипинат	240	п.п.	4,5
изофталат	240	»	4
себакат	240	»	4,5
сукцинат	240	»	4,5
OV			
1 (метилсиликон)	350	н.	4
17 (метилфенилсиликон)	300	п.п.	4
25 (фенилсиликон)	300	»	4
101 (метилсиликон, жидк.)	300	н.	4
225 (цианпропилметилфенилметилсиликон)	275	п.п.	4

Фаза	Максимальная температура, °C	Полярность[а]	Растворитель[б]
β,β'-Оксидипропионитрил	100	п.	5
Полиэтиленимин	250	»	7 (нагр.)
Поли-*м*-фениловый эфир (полимер)	400	п.п.	8
Себакат полипропиленгликоля	225	»	4
Полипропиленгликоль с $AgNO_3$	75	с.	4,5
Пропиленкарбонат	60	п.	5
Поливинилпирролидон	225	п.в.	7
Квадрол	150	в.	4,5
Реоплекс 400	190	п.п.	4,5
Силикон			
D.C. 11	300	н.	2,6
D.C. 220	250	»	4,5
D.C. 703	225	п.п.	4,5
D.C. 710	300	»	4,5
QF-1	250	»	4,5
GE, KE-60 (нитрованная резина)	275	»	4,5
SE-30	300	н.	4,5 (нагр.)
Силиконовая резина SE-30	350	»	4,5 (нагр.)
Спан 80 (моноолеат сорбита)	150	п.	4,5
Сквалан	100	н.	4,5
Тетрацианэтилпентаэритрит	180	п.	5
Трикрезилфосфат	125	п.п.	4,5
Триэтаноламин	75	в.	4,5
Тритон X-305	200	п.	1
Твин 80 (полиэтоксиэтиленсорбита моноолеат)	150	»	4,5
Укон 50 НВ 280 X (полярный)	200	»	4
Версамид 900	250	»	3,4
Ксиленилфосфат	175	п.п.	5

[а] п. — полярный; п. п. — полуполярный; н. — неполярный; в. — образует водородные связи; с. — специфический.

[б] 1 — ацетон; 2 — бензол; 3 — *н*-бутанол; 4 — хлороформ; 5 — метиленхлорид; 6 — этилацетат; 7 — метанол; 8 — толуол; 9 — вода.

каталитического влияния подложки и т. д.) и химически инертной по отношению к хроматографируемым соединениям при рабочей температуре. Некоторые наиболее важные неподвижные фазы перечислены в табл. 10.4.

Выбор неподвижной фазы зависит от состава образца. Поэтому перед началом анализа необходимо располагать максимально возможной информацией о нем. Например, необходимо знать диапазон температур кипения компонентов, их структуру и т. д. Для успешного разделения необходимо, чтобы структура неподвижной фазы была похожа на структуру образца. Например, углеводороды лучше разделяются на парафиновой неподвижной фазе, а полярные компоненты — на полярной неподвижной фазе. Однако, если смесь содержит вещества различной химической природы, но с близкими температурами кипения, необходимы неподвижные фазы различной полярности. В этом случае используются взаимодействия между молекулами сорбата и неподвижной фазы. Во-первых, неспецифическое дисперсионное взаимодействие между молекулами неполярных соединений. При наличии такого взаимодействия разделение происходит в соответствии с давлением паров, т. е. приблизительно в соответствии с температурами кипения. Во-вторых, специфические полярные взаимодействия, которые обусловлены постоянными диполями (разделение в соответствии с полярностью компонентов смеси), индуцированными диполями (разделение в соответствии с поляризуемостью молекул) и образованием химических связей (например, водородных связей между группами —OH, —SH, $—NH_2$, =NH, —CO— и т. д. или связей между ненасыщенными углеводородами и Ag^+, $PdCl_2$).

Некоторые исследователи пытались оценить количественно разность между значениями констант распределения одного и того же соединения в неподвижных фазах различной полярности. Система, предложенная Роршнейдером [76] и Мак-Рейнольдсом [60], до сих пор широко используется. Недавно Новак и сотр. [68] предложили оценивать полярность неподвижных фаз, исходя из парциальной мольной избыточной свободной энергии Гиббса ΔG^E, которая является количественной характеристикой системы анализируемое соединение — неподвижная фаза. При этом предполагается, что результирующая ΔG^E представляет собой сумму отдельных вкладов функциональных групп в молекуле (см. уравнение (10.39) в разд. 10.4.1). Значение ΔG^E принято в качестве стандартного, соответствующего одному «молю» метилена. Это значение вполне применимо для оценки полярности парафиновых углеводородов; его можно также использовать для определения полярных характеристик других соединений. В случае сильнополярной неподвижной

фазы преимущества этой системы теряются, так как хроматографический пик парафинов может быть асимметричным и обладать очень малым объемом удерживания. Экспериментально $\Delta G^E(CH_2)$ (кал/моль) определяется в результате графического решения уравнения

$$\Delta G^E\,(CH_2) = -(RT/0{,}434)\,[d\lg(V_gP)/dn], \qquad (10.31)$$

где R — газовая постоянная, T — абсолютная температура колонки, V_g — удельный объем удерживания, мл, P — давление

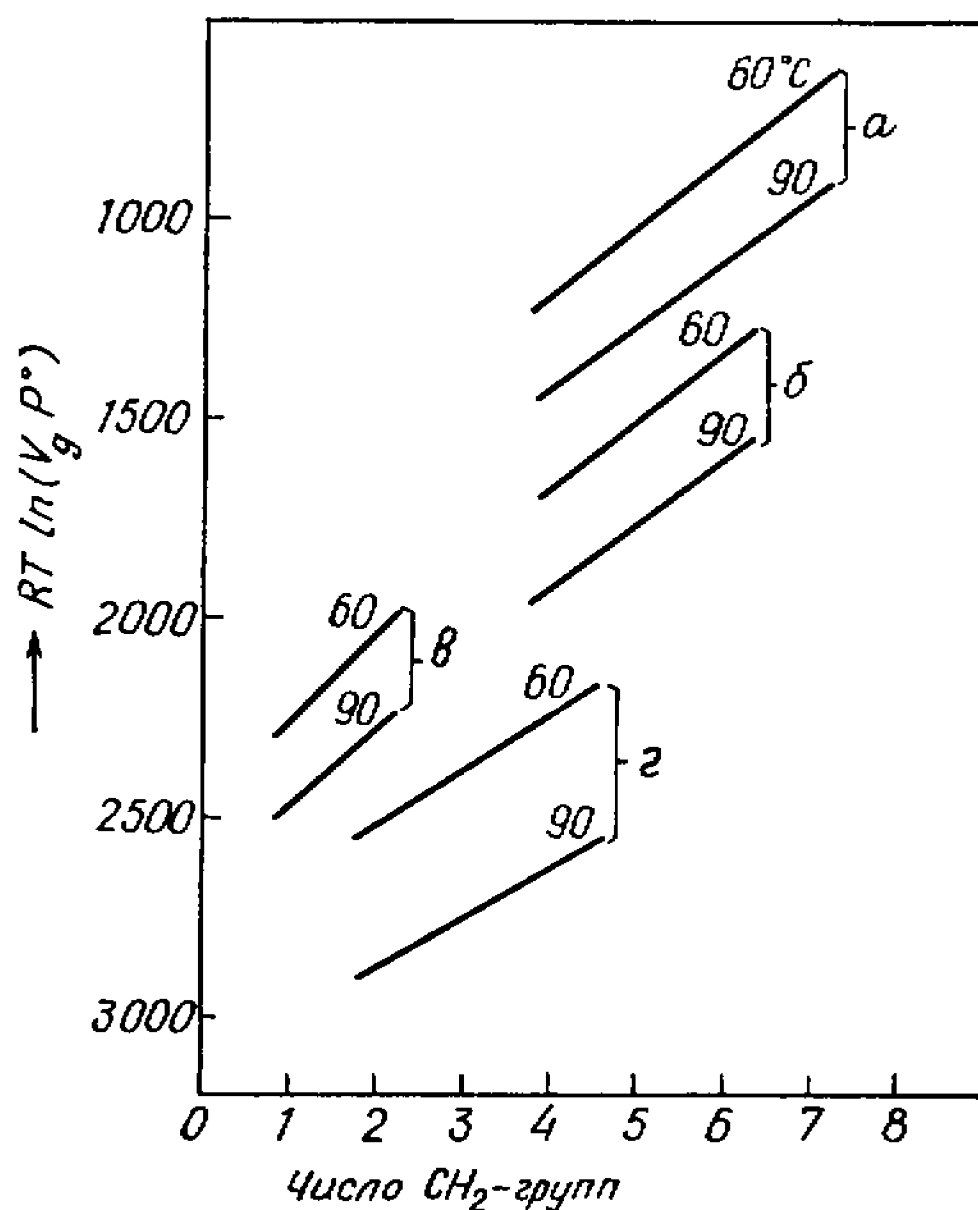


Рис. 10.16. Графическое определение парциальной мольной избыточной свободной энергии Гиббса $\Delta G^E(CH_2)$ для метилена [16].

Тип анализируемых соединений: *а* — алканы; *б* — простые эфиры; *в* — соединения ароматического ряда; *г* — спирты.

насыщенного пара компонента при температуре колонки, атм, и n — число метильных групп в молекуле растворенного вещества.

На рис. 10.16 приведена зависимость $-RT\ln(V_gP)$ от числа метильных групп. Наклон полученной прямой дает $\Delta G^E(CH_2)$. Из рисунка видно, что даже соединения значительно различающиеся по химическим свойствам, дают прямые с практически одинаковым углом наклона. В табл. 10.5 показаны результаты измерений, проведенных для 13 выбранных неподвижных фаз различной полярности. Из табл. 10.5 (так же как и из рис. 10.16)

Таблица 10.5

Полярность некоторых неподвижных фаз, выраженная в $\Delta G^E(CH_2)$ (кал/моль), при различных температурах [68]

Неподвижная фаза	Температура, °C				
	60	70	80	90	среднее
Сквалан	13,2	19,6	18,0	20,1	17,7
Динонилфталат	24,9	31,8	32,9	26,0	28,9
Полифениловый эфир (6 циклов)	58,3	56,2	49,9	50,4	53,7
Силикон DC 200 1000 cstk	81,7	87,0	79,0	82,7	82,6
Фторсиликон QF-1	147	161	145	147	150
Реоплекс 400	183	166	158	150	164
Карбовакс 400	172	168	168	159	167
Диглицерол	210	210	214	228	216
1,2,3-Трис(2-цианоэтокси)-пропан	242	244	239	229	238
Формамид	391	394	392	391	392
Порапак Р 80/100, партия 800	—264	—233	—194	—217	—227
Порапак Т 100/120, партия 686	—156	—143	—150	—138	—147

следует, что улучшить разрешение хроматограмм можно, используя не только различные сорбенты, но и различные рабочие температуры.

Выбор твердых адсорбентов для газо-адсорбционной хроматографии затруднен также в связи с тем, что ряд хроматографируемых соединений дает асимметричные кривые элюирования, образуются так называемые хвосты, которые тем длиннее, чем сильнее соединение сорбируется и чем длиннее колонка. Кроме того, сорбент может иногда проявлять каталитический эффект по отношению к хроматографируемым компонентам. Адсорбенты обычно делятся на неполярные, на которых, как предполагается, наблюдается только физическая адсорбция, и полярные, на которых физическая адсорбция может сопровождаться хемосорбцией. Полностью неполярным можно считать только активный уголь, различные сорта которого отличаются размерами (радиусом) пор (микропоры радиусом 1,5—20 Å и макропоры радиусом 500—20 000 Å). Активный уголь используют главным образом для анализа постоянных газов при комнатной, низкой или высокой температуре. Как полярные адсорбенты применяют силикагель, алюмосиликаты (природные и синтетические), ок-

сид алюминия, молекулярные сита и т. д. Полярность этих материалов обусловлена наличием таких связей, как Si—O, Si—OH, Al—O, Al—OH. Атом водорода в гидроксильной группе проявляет электроноакцепторные свойства; в процессе адсорбции полярных или поляризуемых молекул, выступающих как доноры электронов, имеют место донорно-акцепторные взаимодействия различной силы.

На оксиде алюминия часто проводят разделение смесей постоянных газов или углеводородов C_1 — C_4, на силикагеле — разделение смесей CO, CO_2, N_2, углеводородов C_1 — C_4, оксидов азота и т. д., на молекулярных ситах — разделение смесей редких газов, O_2, N_2, нормальных парафинов и т. д. Некоторые пористые полимеры используются как специальные типы хроматографических адсорбентов. Хорошо известны сополимеры стирола и дивинилбензола, поступающие в продажу под названиями: порапак (P, Q, R, S, T, N), хромосорб 101—105 и синахром. Они характеризуются определенной удельной поверхностью (100—500 $м^2/г$), однородной структурой пор, относительно хорошей термостабильностью (обычно до 250 °C). Порапаки P и Q — неполярные сорбенты, а порапаки R, S, T и N — сорбенты средней полярности. Их поверхность модифицирована специальными мономерами. Синахром похож на порапак Q и хромосорб 102. Механизм разделения на этих сорбентах выяснен не полностью, предполагается, что в системах газ — жидкость и газ — твердый носитель физико-химические взаимодействия сочетаются с чисто химическими. Сорбенты этого типа предпочтительны при разделении полярных соединений, например воды, свободных жирных кислот, спиртов и т. д., на большинстве других адсорбентов их четкого разделения добиться не удается (образуются хвосты).

10.3.2. ТВЕРДЫЕ НОСИТЕЛИ ДЛЯ НЕПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ

Жидкая неподвижная фаза должна фиксироваться на носителе так, чтобы газ легко вступал в контакт с поверхностью жидкости. Хороший твердый носитель должен отвечать следующим основным требованиям. Он должен быть химически инертным и не должен обладать адсорбционной активностью, должен быть каталитически неактивным, механически прочным и термостабильным. Твердыми носителями жидкой неподвижной фазы служат гранулированные материалы с высокой пористостью. Чтобы исключить возможность адсорбции, используются материалы с малой удельной поверхностью — порядка 1—7 $м^2/г$. Средний диаметр пор, соответствующий такой удельной поверхности, равен 1—0,1 мкм. Удельная масса таких материалов обычно лежит в пределах от 2 до 2,4 г/мл, а объемная мас-

са составляет 0,2—0,4 г/мл. Важной характеристикой носителя является его объем пор; у хорошего носителя он равен примерно 1 мл/г.

При покрытии носителя жидкой фазой действуют два механизма: адсорбция и капиллярная конденсация. Количество адсорбированной жидкости незначительно из-за малой удельной поверхности носителя. Емкость этого количества жидкости очень мала, проводить хроматографирование в таких условиях сложно. Небольшие количества неподвижной фазы на носителе используются в тех случаях, когда рабочие температуры ниже температур кипения анализируемых соединений, а константы их распределения велики. При этом носителями обычно служат стеклянные шарики. Степень покрытия этих материалов не превышает 0,05—2,0%. Основную роль играет жидкость, находящаяся в порах носителя. Поры наименьшего диаметра, если они доступны для жидкости, заполняются в первую очередь. С увеличением объема жидкости также возрастает негомогенность пленки по толщине и возрастает коэффициент массопереноса в жидкой фазе C_L [см. уравнение (10.18)]. Для идеально однородной пленки постоянной толщины теоретическое значение C_L должно быть равно 10^{-6}, но реальные значения обычно находятся в интервале от 10^{-4} до 10^{-2}.

Важные характеристики носителя — средний диаметр частиц d_p и распределение частиц по размерам. Широкое распределение частиц по размерам всегда вызывает уменьшение эффективности колонок. В колонках, приготовленных из негомогенных материалов, всегда присутствуют малые каналы, через которые проходит большой объем газа, что вызывает размывание. При этом усиливается вихревая диффузия [см. уравнение (10.16)] и как следствие растет коэффициент λ. Как следует из уравнения (10.20), уменьшение размеров частиц приводит к увеличению эффективности колонки (уменьшаются члены A и C_g). Однако одновременно с уменьшением размеров частиц (уменьшением членов A и C_g) увеличивается перепад давления на колонке. При использовании слишком малых частиц, с одной стороны, требуется высокое давление для поддержания требуемого расхода газа-носителя, а с другой стороны, высокое давление нарушает гомогенность упаковки колонки. Чаще всего применяются носители с размером частиц 100—200 мкм, который считается оптимальным.

Значительное внимание следует уделять механической прочности носителя. Твердость и сопротивление эрозии играют важную роль в процессе покрытия и наполнения колонок. Если частицы разрушаются в процессе упаковки колонки, то распределение их по размерам меняется: расширяется интервал величин d_p, что приводит к ухудшению эффективности колонки. Поэтому

Таблица 10.6

Некоторые характеристики диатомовых земель

	Диатомовая земля	
	белая	розовая
Удельная поверхность		
$м^2/г$	1–2	4—7
$м^2/мл$	0,2	1,9
Удельный объем пор, мл/г	1,5—2,8	0,9—1,2
Плотность, г/мл	2,2	2,2
Насыпная масса, г/мл	0,2	0,4
pH	8—9	6—7

покрывать носитель жидкой фазой и упаковывать колонку необходимо очень осторожно. Некоторые материалы, особенно с высокой концентрацией оксидов алюминия и железа на поверхности, имеют высокую каталитическую активность, что может быть причиной разложения неподвижной фазы при температурах более низких, чем используемые для работы с носителями, не проявляющими каталитической активности. Очевидно, что каталитическая активность связана с относительной интенсивностью адсорбции, и некоторые анализируемые соединения могут даже адсорбироваться в процессе хроматографирования. Следствием этого являются искажение формы пика и потеря некоторого количества образца, поэтому результаты такого анализа нельзя уже интерпретировать количественно. Промывая носители кислотами и щелочами, можно удалить с его поверхности основную массу оксидов железа и алюминия. Большинство фирм, выпускающих носители, обрабатывают их кислотами и щелочами, что указывается на марке носителя: AW (отмыт кислотой) или ABW (отмыт кислотой и щелочью).

Чаще всего носителями служат диатомиты (табл. 10.6). Эти носители состоят главным образом из SiO_2 (примерно 90%), и вследствие этого на их поверхности содержится значительное количество гидроксильных групп, что определяет высокую адсорбционную активность диатомитов, особенно по отношению к полярным соединениям. Результирующее фазовое равновесие в колонке, заполненной диатомитом, определяется двумя процессами: растворением в жидкой фазе и адсорбцией на подложке. Поскольку количество вещества, адсорбированного на твердой поверхности, обычно не прямо пропорционально концентрации, то адсорбцию необходимо подавить по возможности полнее. С этой целью поверхность носителя химически модифицируют.

Полученные при этом модифицированные носители делятся на две группы. В первую группу входят материалы, полученные этерификацией силикагеля, во вторую — материалы с поверхностно-связанными силиконами. В обоих типах носителей поверхностные гидроксильные группы заменены (если они достаточно доступны) на органические функциональные группы с

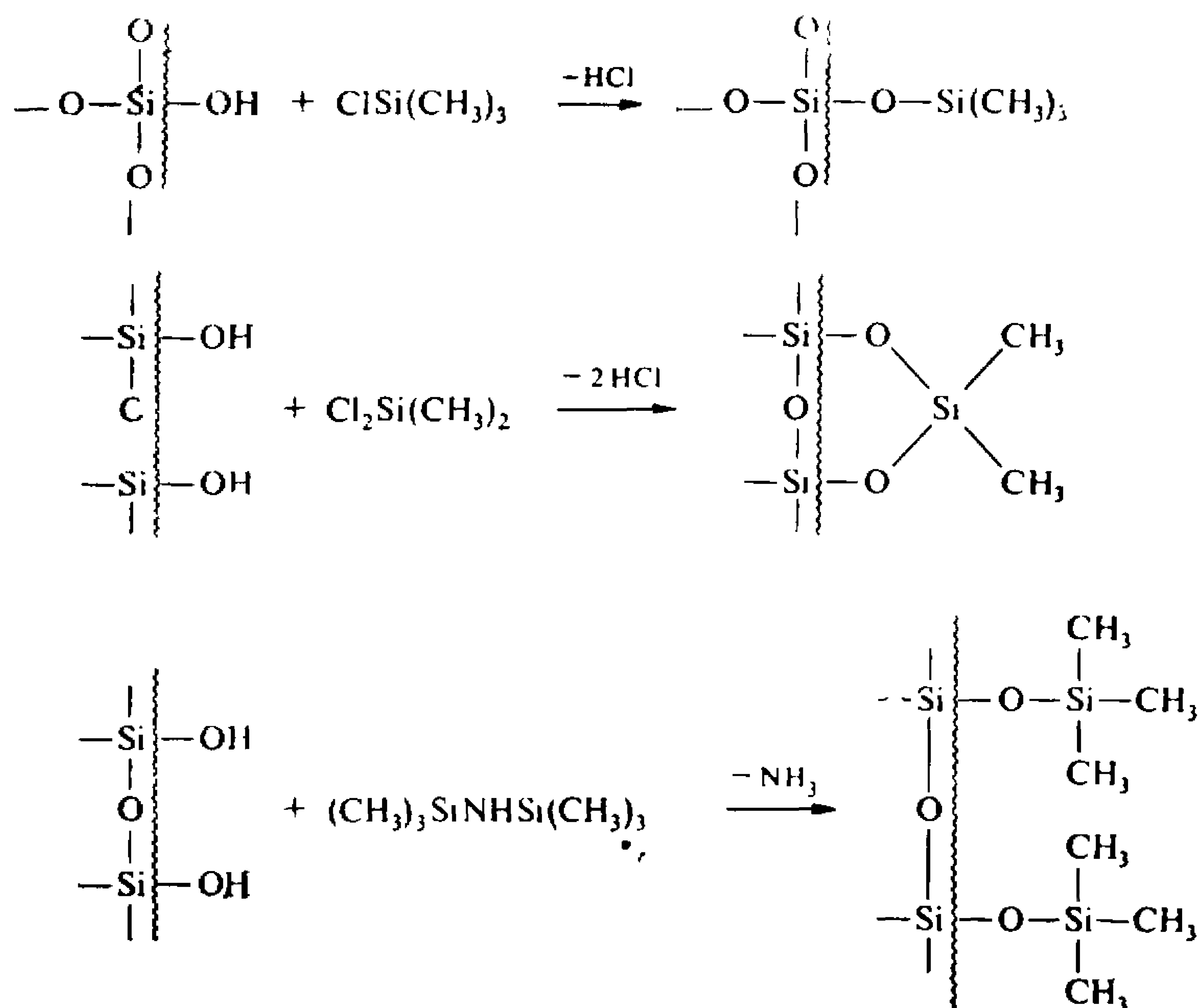


Рис. 10.17. Химическая обработка (силанизация) поверхности носителя неподвижной фазы.

намного меньшей адсорбционной активностью. На рис. 10.17 приведена схема наиболее распространенной модификации — силанизации. Как следует из рисунка, для модифицирования используются триметилхлорсилан, диметилдихлорсилан, гексаметилдисилазан и т. д. Последнее соединение предпочтительно из-за низкой летучести и малой токсичности. Для модификации свойств поверхности пригодны также соединения, придающие поверхности стекла водоотталкивающие свойства; можно также обрабатывать силанизирующими реагентами сами образцы. Почти все готовые носители являются химически модифицированными (использованный модификатор обычно указывается). Известны также и другие методы подавления адсорбционной активности. Можно насытить газ-носитель адсорбатом (обычно водой), которая блокирует большинство адсорбционно актив-

ных центров; но такой метод вносит ряд серьезных экспериментальных трудностей. Полностью насыщенную систему и колонки необходимо тщательно термостатировать, но даже при выполнении этого условия при детектировании возникают серьезные трудности. Поверхность носителя можно также покрывать либо металлом (золото, серебро), либо полимером. Известны носители, покрытые тефлоном; такие носители полностью инертны.

10.3.3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ КОЛОНОК

Описаны различные методы нанесения неподвижной фазы на носитель. Обычная методика заключается в следующем. Необходимое количество неподвижной фазы растворяют в чистом и летучем органическом растворителе. Растворение ведут в колбе, помещенной в баню. В раствор добавляют определенную навеску носителя. Количество раствора должно быть достаточным для полного покрытия носителя жидкостью. Смесь выдерживают час, периодически перемешивая, после чего отгоняют растворитель под вакуумом (водоструйный насос), нагревая смесь на водяной бане. Правильно приготовленный твердый носитель должен быть рыхлым, и от него не должно пахнуть растворителем. Твердый носитель также не должен содержать пыли.

Операция заполнения колонок достаточно проста, однако проводить ее следует очень тщательно, поскольку эффективность колонки в значительной степени зависит от правильности упаковки. Твердый носитель вводят в колонку маленькими порциями через воронку, периодически постукивая по стенкам колонки. Время от времени необходимо также постукивать нижним концом колонки об пол или твердую подставку. Хроматографический носитель должен равномерно заполнять всю колонку, иначе могут образовываться небольшие каналы с пониженным сопротивлением прохождению газа-носителя. Раньше для упаковки рекомендовалось применять различного рода вибрационные установки, но позднее было обнаружено, что лучше уплотнять материал, просто постукивая по колонке. Прямые или U-образные колонки легко упаковываются, спиральные колонки упаковывать труднее; в последнем случае рекомендуется использовать давление на входе в колонку и вакуумирование на выходе, а также постукивать по колонке. Металлическим колонкам можно придавать необходимую форму уже после того, как они заполнены. Упакованные колонки затыкают пробками из стекловаты.

Приготовленные колонки перед использованием подвергают предварительной обработке. С этой целью колонки нагревают несколько часов при температуре, на 25 °C превышающей рабо-

чую температуру, пропуская через колонку газ-носитель со скоростью примерно 5—10 мл/мин. Выход из колонки при этом должен быть отключен, чтобы предотвратить загрязнение детектора. В ходе такой обработки из колонки удаляются последние следы растворителя и легкокипящих компонентов, которые могут присутствовать в неподвижной фазе, и неподвижная фаза более равномерно распределяется по носителю.

10.3.4. НАНЕСЕНИЕ НЕПОДВИЖНОЙ ЖИДКОЙ ФАЗЫ (НЖФ) НА ВНУТРЕННЮЮ ПОВЕРХНОСТЬ КАПИЛЛЯРНЫХ КОЛОНОК

Перед началом работы с капиллярной колонкой ее внутренние стенки необходимо очистить от примесей, в частности консервирующих реагентов или следов грязи, оставшихся при изготовлении капилляра. Металлические капиллярные колонки промывают главным образом органическими растворителями, например хлороформом, ацетоном, метанолом, гексаном, диэтиловым эфиром. Колонки из нержавеющей стали, а иногда и стеклянные колонки промывают хромовой смесью. С этой целью растворитель обычно прокачивают через колонку под давлением инертного газа. Для нанесения НЖФ, как правило, используется специальное оборудование (см. далее). После очистки колонку высушивают током газа-носителя.

Голей [28], автор первой работы по капиллярным колонкам, описал статический метод нанесения НЖФ. Согласно предложенной им методике, закрытую с одного конца колонку заполняют раствором неподвижной фазы в растворителе и заполненную колонку медленно протягивают через нагреваемую печь, причем в печь колонку вводят сначала открытым концом. Летучий растворитель испаряется из колонки, и на стенках капилляра образуется пленка неподвижной фазы. Когда процесс образования пленки закончится, остатки растворителя удаляют из колонки потоком газа-носителя. Недостаток данного метода — относительная сложность оборудования, кроме того, таким способом нельзя наносить НЖФ на стеклянные капилляры, поскольку требуемую форму колонке придают уже после нанесения НЖФ.

В настоящее время наиболее широко используется динамический метод нанесения НЖФ, требующий простого оборудования (рис. 10.18). Раствор неподвижной жидкой фазы в соответствующем растворителе (нанесение неподвижной жидкой фазы на носитель см. в ч. 1, гл. 2) помещают в сосуд *2*. Очищенную и высушенную капиллярную колонку *3* соединяют с сосудом *2*, который в свою очередь соединяют с сосудом *1*, содержащим газ. Раствор продавливают через колонку с постоянной ско-

ростью потоком газа-носителя (гелия, аргона, азота или водорода). Скорость не должна превышать 2—10 см/с, иначе образуется пленка неподвижной фазы неравномерной толщины, поэтому необходим источник газа-носителя, дающий постоянный поток газа (например, электролитическая ячейка), а не поток газа постоянного давления, как в обычной хроматографии. Как только колонка *3* наполнится раствором, сосуд *2* от-

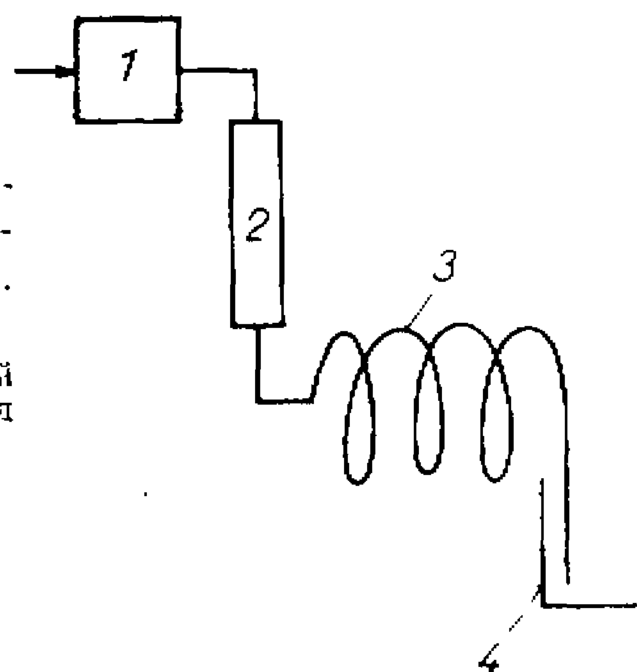


Рис. 10.18. Прибор для нанесения жидкой неподвижной фазы в капиллярные колонки динамическим методом.

1 — источник постоянного давления; *2* — резервуар с раствором неподвижной жидкой фазы; *3* — капиллярная колонка; *4* — сосуд для слива.

ключают и жидкость из колонки выдавливают потоком газа в сосуд *4* с той же скоростью, с которой колонка наполнялась. Как только из колонки удалится весь раствор, скорость потока газа-носителя медленно поднимают до рабочего значения (3—5 мл/мин). Колонку кондиционируют в токе газа довольно долго (3—5 ч), чтобы удалить остатки растворителя.

Методы динамического покрытия капиллярных колонок можно разделить на две группы: 1) методы, в которых используется объем раствора НЖФ, превышающий объем заполняемого капилляра, и 2) методы, в которых используется объем раствора НЖФ, меньший объема заполняемого капилляра. Оба метода отличаются главным образом способом определения количества неподвижной фазы, остающейся в колонке в виде тонкой пленки.

Нанесение НЖФ по первому методу проводят описанным выше способом. После окончания нанесения НЖФ колонку отсоединяют и взвешивают. По разности масс сухой и заполненной колонок определяют количество нанесенной неподвижной фазы M. Толщину пленки d_f рассчитывают по уравнению

$$d_f = M/2\pi d_L r L, \qquad (10.32)$$

где d_L — плотность НЖФ, r — радиус колонки, L — ее длина. Очевидно, что ввиду относительно высокой массы колонки при небольшом количестве неподвижной фазы достаточно точно определить M практически невозможно. Поэтому было предложено использовать для нанесения НЖФ такой объем раствора,

который составлял бы только 10% объема колонки. На рис. 10.18 показана схема устройства для нанесения НЖФ. В него входят две калиброванные бюретки равного диаметра, которые помещают между сосудом *2* и колонкой и колонкой и сосудом *4*. В первой бюретке отмеряется объем V_1 раствора НЖФ. Этот раствор продавливают через колонку *3* таким же способом, как это описано выше. Вышедший из колонки объем раствора V_2 точно измеряется во второй бюретке. Если концентрация *c* (об.%) раствора неподвижной фазы известна, то толщину пленки можно рассчитать:

$$d_f = (V_1 - V_2)c/200Lr \quad (10.33)$$

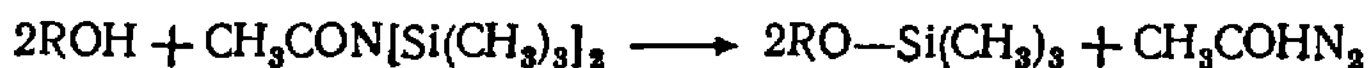
О гомогенности пленки жидкости в капилляре судят по эффективности приготовленной колонки. Известно, что даже при одинаковых качестве исходного материала и методике подготовки колонки перед нанесением приготовить две колонки одинаковой эффективности практически не удается. Некоторые материалы проявляют адсорбционные свойства, что уменьшает не только эффективность колонки, но и фактор емкости. Например, медь вызывает сорбцию, которая проявляется в каталитической активности поверхности колонки. Некоторые неподвижные фазы разлагаются в медных капиллярах даже при 150 °С. По этой причине стеклянные капилляры предпочтительны. Однако, чтобы получить гомогенные пленки, стеклянные капилляры необходимо подвергать специальной обработке перед нанесением НЖФ. Можно, например, протравить внутренние стенки капилляра 17%-ным раствором аммиака при 180 °С [61], фторидом [84] или хлоридом водорода. При использовании последних двух соединений стеклянные колонки после обработки заполняют кислым раствором, запаивают с обоих концов и выдерживают некоторое время при повышенной температуре. После этого колонки открывают, промывают и высушивают и затем одним из описанных выше способов наносят НЖФ. Иногда поверхность капиллярной колонки модифицируют. Методика модификации поверхности колонки сходна с методикой модификации поверхности инертного носителя (см. разд. 10.3.2).

Капиллярные колонки можно также заполнить слоем твердого носителя, покрытого неподвижной фазой [19, 29а].

10.3.5. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Твердые, а иногда и жидкие образцы (особенно если они вязкие) следует вводить в колонку в виде раствора в легколетучем растворителе. Растворитель должен быть очень чистым, и его хроматографический пик не должен влиять на пики иссле-

дуемых соединений. Некоторые соединения из-за низкой термостойкости, асимметричных хроматографических пиков, неподходящих факторов разделения или низкой летучести лучше анализировать в виде производных*. Так, например, карбоновые кислоты, сахара, фенолы и спирты можно количественно перевести в менее полярные и более термостойкие производные, у пиков которых наблюдаются существенно меньшие хвосты. Однако следует помнить, что удаление сильно полярных групп из молекулы приводит к уменьшению селективности неподвижной фазы, а это в свою очередь ведет к ухудшению разделения изомеров с близкими температурами кипения, но если давление паров таких производных достаточно, то разделение можно улучшить. В настоящее время наиболее популярно получение силоксановых производных. Сахара, фенолы, спирты, гликоли, кислоты, амины и т. д. вступают в реакцию с силоксанами количественно. Никакой специальной аппаратуры для получения силильных производных не требуется. Раньше в качестве силанизующего реагента использовался чистый гексаметилдисилазан; затем его начали смешивать с триметилхлорсиланом в соотношении 2:1. В последнее время с этой целью стали часто использовать бис(триметилсилил)ацетамид, который реагирует с исследуемыми соединениями на холоду. Реакция бис(триметилсилил)ацетамида с гидроксилсодержащими соединениями протекает следующим образом:



$$2ROH + CH_3CON[Si(CH_3)_3]_2 \longrightarrow 2RO{-}Si(CH_3)_3 + CH_3COHN_2$$

Продукты силанизации стабильны, и перед хроматографированием обычно их не выделяют из реакционной смеси. Силанизующие же реагенты настолько летучи, что даже при большом их избытке они появляются в самом начале хроматограммы и не мешают определению разделяемых компонентов.

Для получения производных соединений с малой реакционной способностью применяют также бис(триметилсилил)трифторацетамид и N-триметилсилилдиэтиламид. Помимо силанизации используется также ацетилирование N-метилбис- и бис(трифторацетамидом).

Мы считаем наилучшей следующую методику: в маленькой колбе объемом 5—10 мл взвешивают 0,2—0,1 г образца, колбу закрывают резиновой пробкой и вводят шприцем избыток бис(триметилсилил)ацетамида. После чего смесь энергично встряхивают и оставляют на 15 мин. Если реакция течет нормально, колба нагревается и получается чистый раствор. Для ввода образец отбирается непосредственно шприцем из колбы.

* Более подробно эти важные методы описаны в книге В. Г. Березкина (Химические методы в газовой хроматографии. — М.: Химия, 1980). — *Прим. ред.*

10.4. КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

При настоящем уровне развития газовой хроматографии основной упор делается на качественное определение и разделение компонентов. Все чаще и чаще идентификация, основанная на характеристиках удерживания, оказывается несостоятельной и недостаточной, особенно в исследовательских работах. Основная причина, стимулирующая разработку новых методик идентификаций в газовой хроматографии, состоит в следующем: основным направлением хроматографии становится не анализ тех относительно простых смесей (главным образом углеводородов), с которых, собственно, и начиналась газовая хроматография, а исследование сложных смесей природных соединений и биологических материалов. Выделенные стандартные соединения в таких случаях обычно отсутствуют, а ряд компонентов анализируемой смеси почти всегда неизвестен. Поэтому не исключено перекрывание или неправильная идентификация пиков некоторых компонентов.

Именно поэтому в настоящее время такое внимание уделяется разработке селективных детекторов, по этой же причине хроматографический анализ дополняют спектрометрическим анализом, главным образом масс-спектрометрией. Примечательно, что при этом газовая хроматография не деградирует в простой метод разделения. Напротив, объединение этих двух аналитических методов расширяет возможности каждого из них. Тем не менее идентификация анализируемых компонентов по характеристикам удерживания (время удерживания, объем удерживания, относительный объем удерживания, индексы удерживания, и т. д.) используется все-таки чаще всего, поскольку этот метод очень прост и поскольку сложного хроматографического оборудования при этом не требуется [73].

10.4.1. ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОМПОНЕНТОВ СМЕСИ ПО ХАРАКТЕРИСТИКАМ УДЕРЖИВАНИЯ

Хроматограмма позволяет получить три основных параметра: интервал удерживания (время или объем), ширину (мм, мл объема газа-носителя, время) и высоту пика. Способ идентификации по ширине пика [75] не нашел широкого применения. Ширина пика зависит не только от адсорбционных процессов, протекающих в колонке, но и от диффузионных процессов, на которые в значительной степени влияют экспериментальные условия, вследствие этого идентификация по ширине пика чрезвычайно затруднена.

Необходимо отметить, что без предварительной, по крайней мере ориентировочной, информации об анализируемой смеси

идентификация по характеристикам удерживания практически невозможна, и даже в наилучших случаях результаты такой идентификации весьма неопределенны. Теоретически можно сравнить (например, J. Chromatography, разд. Data Section или [11]) опубликованные данные по удерживанию с параметрами удерживания, полученными экспериментально. Эта методика не дает достаточно удовлетворительных результатов отчасти потому, что приведенные в литературе данные могут отличаться от результатов, полученных экспериментально при приблизительно одинаковых условиях. Нельзя гарантировать достаточную идентичность основных экспериментальных условий, например, качество твердого носителя (часто даже две партии одного и того же материала одной фирмы резко различаются [16]), температура термостата, влияние неподвижной фазы, газа-носителя и т. д. могут варьировать. Чаще всего проводится простое сравнение удельного объема удерживания компонента с объемом удерживания стандартного соединения. Если указанные объемы удерживания совпадают в пределах ошибки эксперимента, то предполагается, что стандарт и анализируемое соединение идентичны. Приведем одно из простейших уравнений для расчета удельного объема удерживания V_g:

$$V_g = (273R/M)(1/\gamma^0 p), \qquad (10.34)$$

где R — газовая постоянная, M — молекулярная масса неподвижной фазы, p — давление насыщенных паров чистого анализируемого соединения, γ — коэффициент активности. Это уравнение показывает, что ни в газо-жидкостной, ни в газо-адсорбционной хроматографии $\gamma^0 p$ не может рассматриваться как специфическое для данного компонента. Поэтому с теоретической точки зрения убедительными могут считаться только те эксперименты, в которых не наблюдается совпадения объемов удерживания исследуемого и стандартного соединений. Если два или более компонентов смеси имеют одинаковые характеристики удерживания, довольно часто наблюдается перекрывание пиков. В этом случае невозможно идентифицировать компоненты простым сравнением.

Корреляция характеристик удерживания с другими свойствами соединений отчасти помогает идентификации. Рассмотрим общие теоретические положения, на которых основана корреляционная хроматографическая идентификация. Изменение свободной энергии Гиббса для адсорбции одного моля растворенного вещества в неподвижной фазе ΔG^0_s определяется выражением

$$\Delta G_s^0 = -RT \ln p + RT \ln \gamma^0, \qquad (10.35)$$

где T — абсолютная температура. Второй член правой части уравнения (10.35) является парциальной мольной избыточной

свободной энергией анализируемого соединения

$$\Delta G^E = -RT \ln \gamma^0 \qquad (10.36)$$

Он характеризует отклонения сорбционного процесса от линейной зависимости. Решая совместно уравнения (10.34) и (10.35), можно показать, что объем удерживания является функцией $\Delta G^0{}_s$:

$$\Delta G_s^0 = -RT \ln (273R/MV_g) \qquad (10.37)$$

Аналогичным образом из уравнений (10.34) и (10.36) получаем

$$\Delta G^E = -RT \ln (V_g p) + RT \ln (273R/M) \qquad (10.38)$$

Теоретически и экспериментально подтверждено, что ΔG^E — аддитивная функция избыточной свободной энергии одиночных групп молекулы

$$\Delta G^E = \Sigma \Delta G^E\,(A) + \Sigma \Delta G^E\,(B) + \ldots + \Sigma \Delta G^E\,(N) \qquad (10.39)$$

где A, B, ..., N — функциональные группы молекулы. Поэтому в гомологических рядах соединений с увеличением числа функциональных групп в молекуле наблюдается увеличение энергии.

Для молекул типа $(CH_3)_m(CH_2)_nX$, как показали Новак и сотр. [69], наиболее целесообразно использовать для корреляции с удерживаемыми объемами метиленовые группы (CH_2). При совместном решении уравнений (10.38) и (10.39) получается выражение

$$\Delta G^E\,(CH_2) = -RTd \ln (V_g p)/dn, \qquad (10.40)$$

где n — число метиленовых групп в молекуле. Зависимость $-\ln(V_g p)$ от n (рис. 10.16) для одного гомологического ряда имеет вид прямой, наклон которой равен $\Delta G^E/RT$. Можно также построить кривую зависимости $\ln V_g$ от числа углеродных атомов в молекуле или от молекулярной массы и т. д. Вместо V_g можно использовать относительное удерживание $r_{1,2}$, приведенный объем удерживания V'_R или время удерживания t_R и другие параметры, полученные из характеристик удерживания. На рис. 10.19 и 10.20 приведены примеры таких зависимостей. Для корреляции пригодны другие параметры анализируемых соединений, которые неявно входят в уравнение (10.34), например температура кипения T_b. Используя постоянную Больцмана R (кал·моль·град$^{-1}$) и уравнение Антони, получаем [52]: $p=f(R, T_b)$. В логарифмической форме после введения констант, удовлетворяющих достаточно широкому ряду соединений, это выражение принимает следующий вид:

$$\lg p = 2{,}9 + 0{,}22k - 0{,}22kT_b/T \qquad (10.41)$$

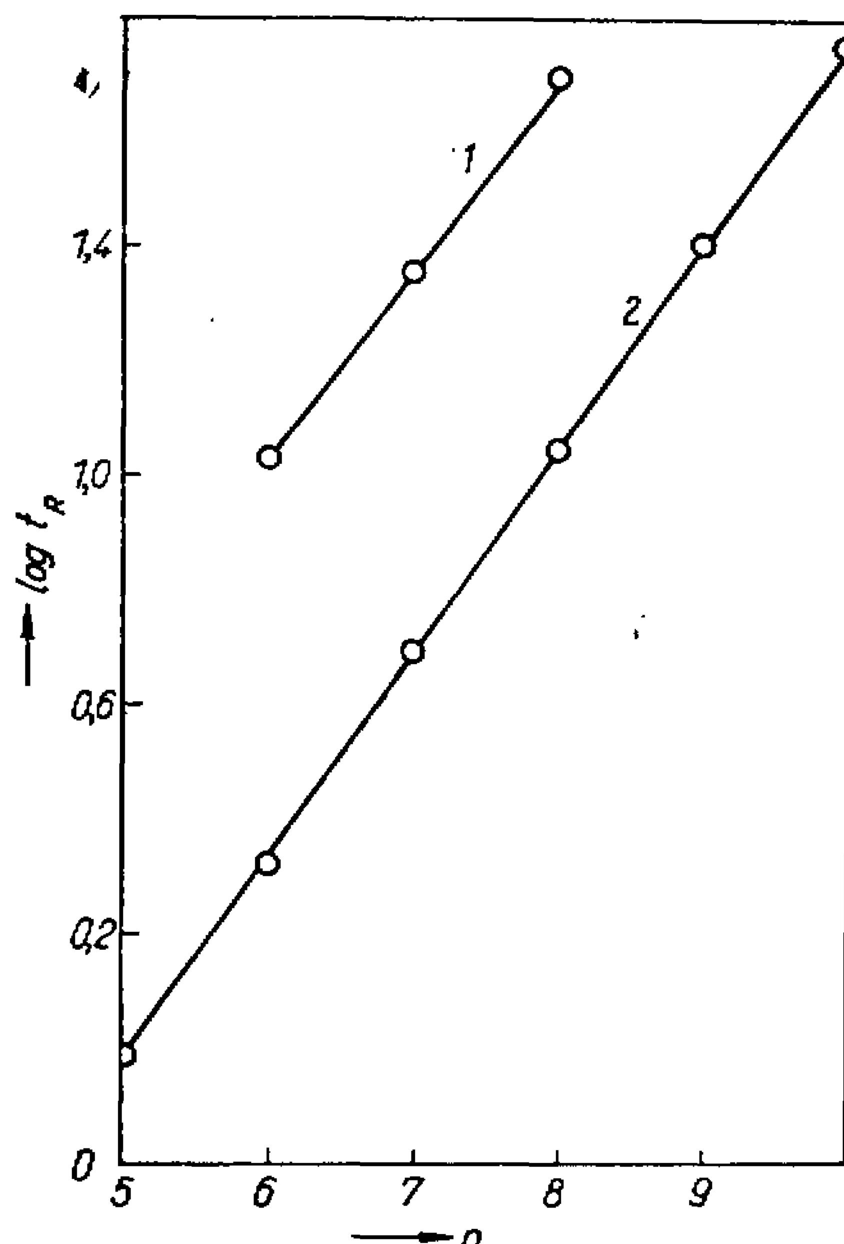


Рис. 10.19. Зависимость времени удерживания (t_R) от числа атомов углерода (n) в молекуле анализируемого соединения.

Температура колонки 78 °С; неподвижная фаза — бензилдифенил; 1 — соединения ароматического ряда; 2 — парафины.

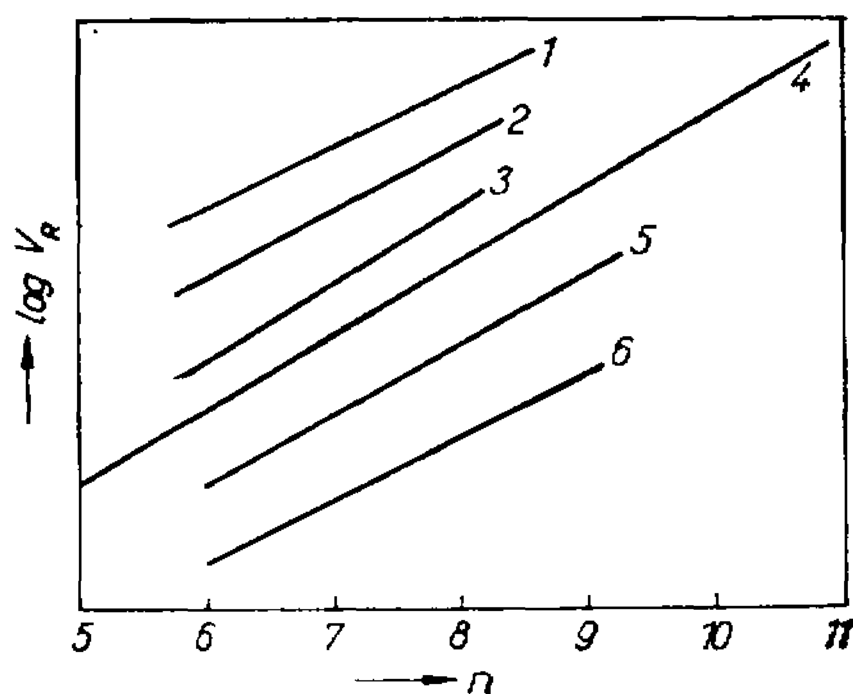


Рис. 10.20. Зависимость объема удерживания (V_R) от числа атомов углерода (n) в молекулах соединений одного гомологического ряда.

1 — соединения ароматического ряда; 2 — циклопентаны; 3 — *н*-олефины; 4 — алканы; 5 — 2-метилпарафины; 6 — 2,2-диметилпарафины.

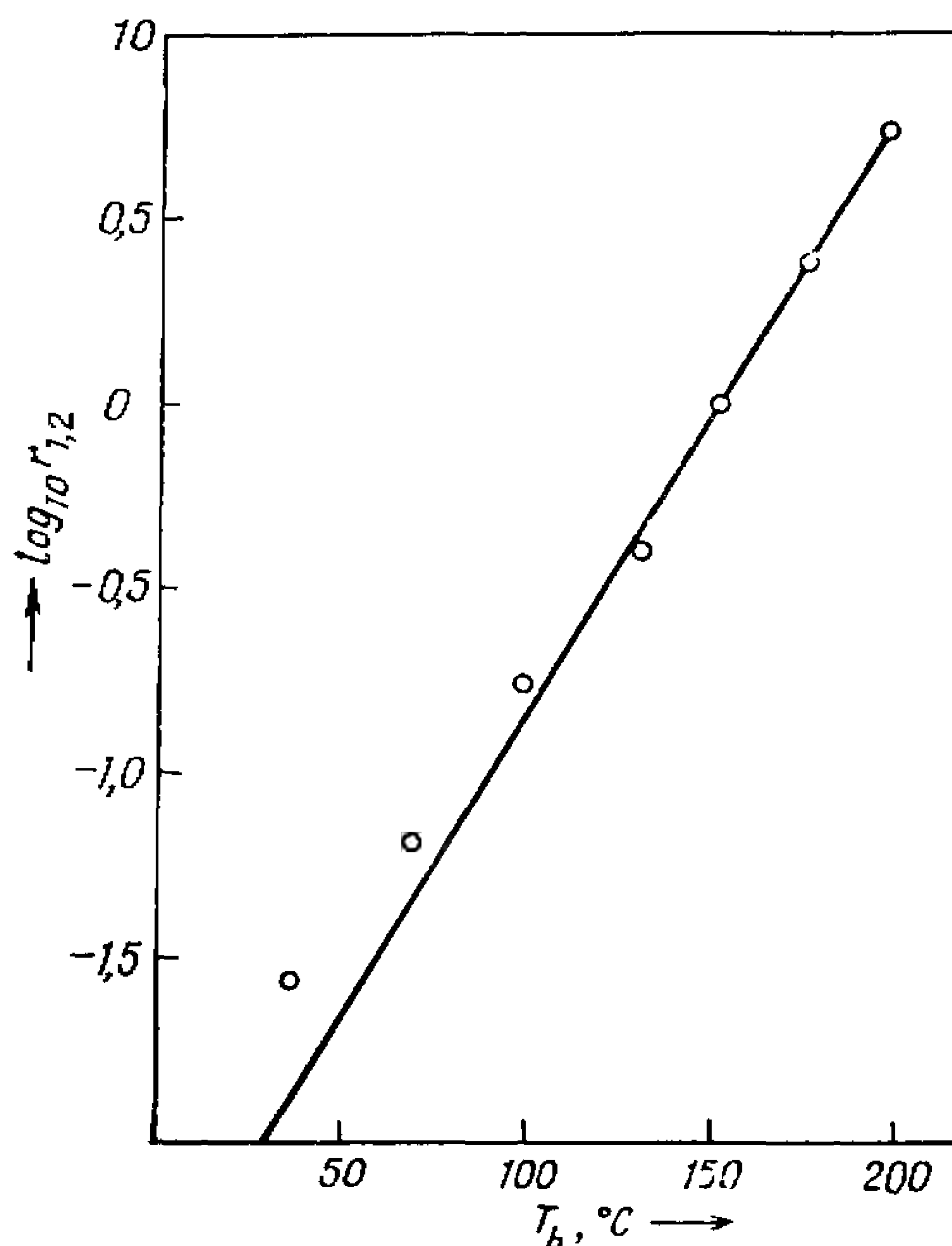


Рис. 10.21. Зависимость относительного удерживания ($r_{1,2}$) алканов C_5—C_{11} от температур кипения (T_b).

Температура 65 °С; неподвижная фаза — сквалан; $r_{1,2}$ определено относительно *н*-нонана.

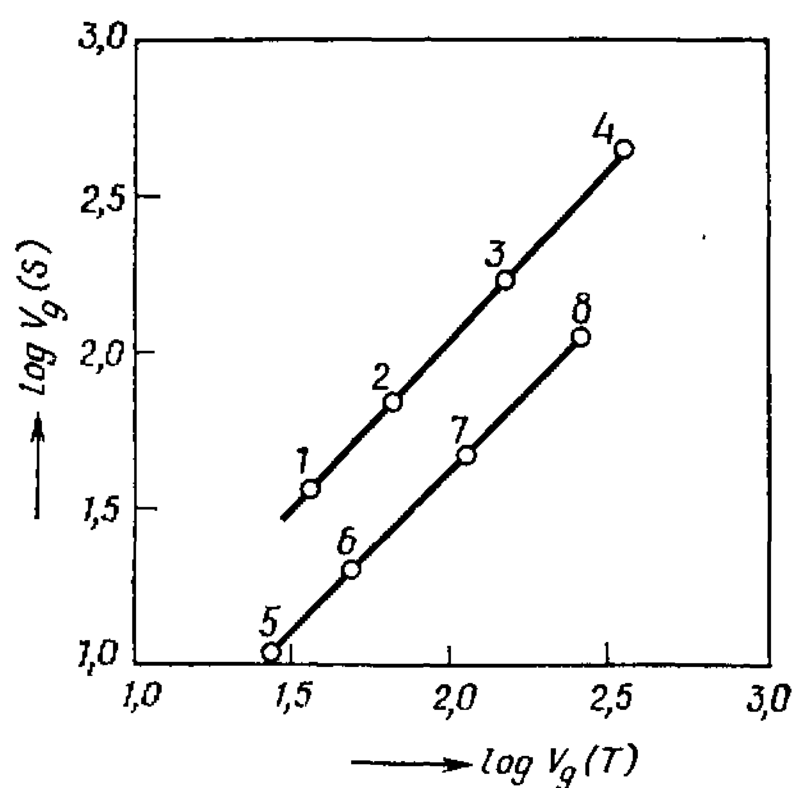


Рис. 10.22. Зависимость характеристик удерживания на двух неподвижных фазах — силиконе (S) и трикрезилфосфате (T).

Температура колонки 78 °С; *1* — метилацетат; *2* — этилацетат; *3* — пропилацетат; *4* — бутилацетат; *5* — метанол; *6* — этанол; *7* — пропанол; *8* — бутанол.

где T — рабочая температура. В логарифмической форме после введения членов из уравнения (10.41) уравнение (10.34) принимает вид

$$\lg V_g = \lg 273R/M - \lg \gamma^0 - 2{,}9 - 0{,}22k - 0{,}22kT_b/T \quad (10.42)$$

Пример зависимости характеристик удерживания от температуры кипения приведен на рис. 10.21. Это выражение можно также с успехом применять для определения температуры кипения неизвестных соединений [81].

Для гомологических рядов наклон прямой зависимости (или других характеристик удерживания) от числа характеристических групп в молекуле (или молекулярной массы, температуры кипения, и т. д.) определяется полярностью неподвижной фазы. Поэтому весьма полезно сопоставлять характеристики удерживания, полученные экспериментально на двух неподвижных фазах с различной полярностью (рис. 10.22). При таком сопоставлении необходимо внимательно следить за порядком появления компонентов на двух хроматограммах, так как он может меняться, а при этом неизбежны ошибки. Ориентироваться можно по различию в количестве (высота пика) компонента в смеси; если пики перекрываются, это может быть очень сложно. Возможности ошибки можно избежать, используя метод, разработанный Грантом [29а].

10.4.2. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ УДЕРЖИВАНИЕ И ИНДЕКСЫ УДЕРЖИВАНИЯ

Как уже отмечалось, на абсолютные значения объема удерживания (времени) могут влиять ошибки эксперимента. Удельный объем удерживания также зависит от точности определения массы неподвижной фазы, введенной в колонку. Избежать здесь ошибок трудно, а в некоторых случаях вообще невозможно, например сложно учесть потерю неподвижной фазы в процессе эксплуатации колонки вследствие летучести и т. д. Удельный объем удерживания не дает достаточно информации относительно сорбционных свойств анализируемого соединения.

Влияние экспериментальных ошибок на результаты хроматографирования можно значительно снизить, заменив абсолютные величины характеристик удерживания на относительные:

$$r_{i,s} = V_{Ni}/V_{Ns} = V_{gi}/V_{gs} = (t_{Ri} - t_M)/(t_{RS} - t_M) \quad (10.43)$$

где индексами i и s обозначены определяемый компонент и стандарт соответственно. Стандарт выбирают так, чтобы его характеристики удерживания лежали между характеристиками удерживания исследуемых компонентов. Это необходимо как

для более точного измерения характеристик удерживания, так и из адсорбционных требований (пик стандартного соединения должен быть симметричным и т. д.). Поэтому очевидно, что попытки найти универсальное стандартное соединение (см. [20, 21]) не увенчались успехом. На колонках с твердым носителем существенно различной полярности характеристики удерживания такого соединения будут сильно различаться, поэтому результаты определения окажутся неудовлетворительными.

Попытки систематизировать расчет значений удерживания стандартных соединений не привели к успеху. Например, некоторые авторы [20] рекомендуют рассчитывать относительное удерживание анализируемого компонента как геометрическое среднее значений удерживания соседних *н*-парафинов и относить полученное значение к системе, в которой *н*-пропан — универсальный стандарт.

Трудности, возникающие из-за использования для идентификации относительных характеристик удерживания, в значительной степени были преодолены Ковачем [46], который ввел индексы удерживания. Система индексов удерживания основана на выражении характеристик удерживания с помощью шкалы характеристик удерживания нормальных парафинов, которая дает стократное увеличение на один атом углерода в молекуле. Индексы удерживания рассчитываются из объемов удерживания (или других характеристик) анализируемого соединения и по крайней мере двух *н*-парафинов, кипящих в той же области. Чистый объем удерживания определяется выражением

$$I = 100[z + n(\lg V_{N(i)} - \lg V_{N(z)})/(\lg V_{N(z+n)} - \lg V_{N(z)})] \quad (10.44)$$

или

$$I = 100[z + n(\lg r_{i,z}/\lg r_{(z+n),z}], \quad (10.45)$$

где z — число атомов углерода в последнем парафине, который элюируется перед веществом i, а $z+n$ — число атомов углерода в первом парафине, элюируемом после вещества i. Графический метод расчета показан на рис. 10.23*.

* Все используемые в настоящее время величины удерживания характеризуются недостаточной межлабораторной воспроизводимостью. Объясняется это следующим обстоятельством. Газо-жидкостная хроматография фактически является газо-жидко-твердофазной хроматографией, в которой роль твердой фазы выполняет твердый носитель, и практически неконтролируемая адсорбция на поверхности твердого носителя (а в некоторых случаях и на поверхности раздела газовая фаза — НЖФ) приводит к тому, что величины удерживания (относительный объем удерживания, индекс удерживания и др.) изменяются в зависимости от типа твердого носителя, его характеристик и т. д. Методы учета адсорбции хроматографируемых соединений в газо-жидкостной хроматографии систематизированы в обзоре В. Г. Березина [Журнал ВХО им. Д. И. Менделеева, т. 25, № 6, 625 (1980)]. — *Прим. ред.*

Из уравнений (10.44) и (10.45) очевидно, что чистый объем удерживания можно заменить на любые характеристики удерживания, например время удерживания или интервал удерживания на хроматограмме. Поскольку (см. рис. 10.19) зависимость $\lg V_N$ от числа атомов углерода в молекуле *n*-парафина линейна (обычно эта зависимость хорошо выполняется для всех

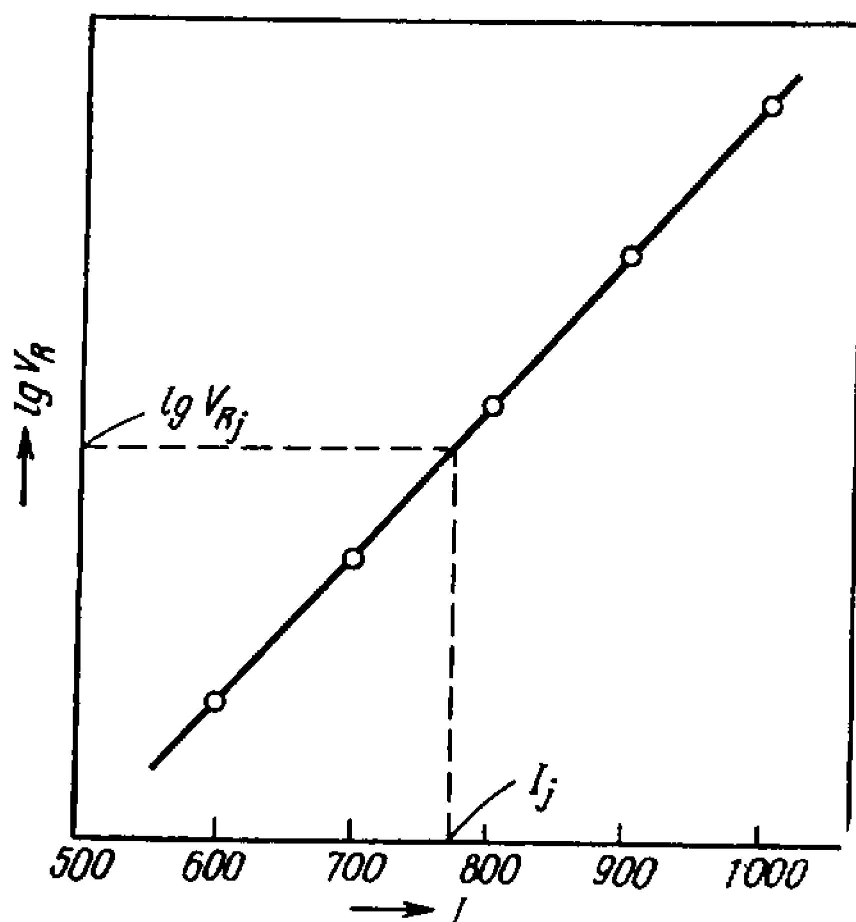


Рис. 10.23. Пример использования индексов удерживания.
I — индекс удерживания [см. уравнения (10.44), (10.45)]; V_R — объем удерживания; *j* — анализируемый компонент. Точки на прямой линии соответствуют *н*-парафинам C_6—C_{10}.

членов гомологического ряда, кроме первых), уравнение (10.44) можно записать как

$$I = 100z + 100/bz(\lg V_{N(i)} - \lg V_{N(z)}), \tag{10.46}$$

где

$$b = (\lg V_{N(z+n)} - \lg V_{N(z)})/n \quad \text{(см. рис. 10.23)}$$

I — линейная функция температуры колонки в минус первой степени, это указывается зависимостью $\partial I/\partial T$. Например, символ $\partial I_i^{\text{апиезон L}} = 3{,}7$ означает, что индекс удерживания соединения *i* на колонке с апиезоном L в качестве неподвижной фазы изменяется на 3,7 единицы при изменении температуры на 10 °С. Символ ∂I также используется для указания разности индексов удерживания двух соединений на одной неподвижной фазе. Разность индексов удерживания соединений, хроматографируемых при одинаковой температуре, но на различных неподвижных фазах, указывается как ΔI. Хороший набор хроматографических характеристик обеспечивается $\partial I/10$ °С, значением *I* для середины температурного интервала и используемым температурным интервалом.

Ковач [46—48] и другие исследователи, например авторы [18], вывели несколько важных правил, не все эти правила подкреплены расчетами, но тем не менее они полезны как при выборе хроматографических условий, так и при идентификации анализируемых соединений.

1. Для высших членов гомологического ряда индексы удерживания увеличиваются на 100, с прибавлением в молекуле каждой новой CH_2-группы. В ряде случаев, особенно для сильно полярных систем, наблюдаются отклонения от этого правила. Новак [66] теоретически предсказал, что отклонения могут увеличиваться с увеличением парциальной мольной энергии Гиббса $\Delta G^E(CH_2)$:

$$\ln [V_{N\,(z+1)}/V_{N\,(z)}] = -1/RT\,[\Delta G^0_C\,(CH_2) + \Delta G^E\,(CH_2)]. \quad (10.47)$$

2. Для неполярной неподвижной фазы разность индексов удерживания двух изомеров можно оценить по соотношению

$$\partial I \sim \partial T_b, \quad (10.48)$$

где T_b — температура кипения. Однако это соотношение часто не выполняется (см., например, [81]).

3. Индексы удерживания асимметрично-замещенных соединений можно рассчитать из индексов удерживания симметрично-замещенных соединений.

4. Одинаковое замещение в молекулах одинаковой структуры приводит к одинаковому увеличению индексов удерживания.

5. Индексы удерживания неполярных соединений остаются постоянными вне зависимости от полярности неподвижной фазы.

6. Если ΔI определялась на двух неподвижных фазах различной полярности, то разность между величинами ΔI является характеристической величиной, зависящей от молекулярной структуры, и ее можно рассчитать путем сложения вкладов ΔI отдельных групп в молекуле. Таким образом можно идентифицировать неизвестные компоненты на хроматограмме.

В некоторых случаях трудно, а иногда даже невозможно, особенно при разделении на сильнополярной неподвижной фазе, использовать для сравнения гомологический ряд нормальных парафинов. Поэтому ряд авторов рекомендует другие гомологические ряды [1, 34]. Используя метиленовые группы [52, 87] в качестве основного инкремента гомологического ряда, можно получить уравнение [67], позволяющее рассчитывать индексы удерживания путем сравнения различных гомологических рядов.

$$I_{b\,(i)} = I_{a\,(i)} - I_{a\,(b)} + 100z\,(x), \quad (10.49)$$

где $I_{b(i)}$ — индекс удерживания на основании гомологического ряда b для вещества i и т. д., а z — число атомов углерода в

молекуле. Индексы удерживания широко применяются как для расчета данных удерживания, так и в целях идентификации. Высокая информативность (например, индекс I=526 показывает, что в данной хроматографической системе соединение элюируется где-то после *н*-пентана, но ближе к нему, чем к *н*-гексану), простая зависимость от температуры и аддитивный характер парциальных индексов как функции молекулярной структуры — все это способствует их широкому применению.

10.4.3. СЕЛЕКТИВНЫЕ ДЕТЕКТОРЫ

Правильно выбранные селективные детекторы могут существенно упростить идентификацию соединений, а в объединении с характеристиками удерживания могут помочь дать приемлемый ответ относительно состава анализируемой смеси. Селективные детекторы чаще всего используются для идентификации смесей органических соединений, содержащих гетероатомы, например P, S, N, Br, Cl, I или функциональные группы, например —OH, COCH=CH—CO, —NH_2, —CO.

Детектор считается селективным [50], если интенсивность его отклика на одно из соединений значительно выше, чем на другие, при одинаковом содержании этих соединений и одинаковых условиях; селективность считается достаточной при соотношении откликов по крайней мере 10 : 1. Другой подход состоит в сравнении откликов двух детекторов на одно и то же соединение [78]. В принципе это может быть установлено тремя различными путями:

1. Два детектора, селективный и неселективный, подключают к хроматографической системе параллельно или последовательно и на полученных хроматограммах определяют соотношение величин отдельных пиков. Результат одного анализа дает три бита информации: характеристики удерживания, отклик селективного детектора и отклик неселективного детектора. Основное преимущество этого метода состоит в том, что сигналы обоих детекторов получаются при одних и тех же хроматографических условиях, т. е. одинаковое количество вещества попадает в оба детектора (при последовательном соединении) или известно общее количество (при параллельном соединении). Влияние хроматографической колонки (размывание и форма пика) практически полностью исключено.

2. Отклики двух детекторов измеряются раздельно при последовательном анализе на одной колонке. Этот способ используется для большинства коммерческих приборов. Однократного анализа обычно недостаточно из-за ошибок в дозировке пробы. Целесообразнее построить калибровочную кривую для узкой области количеств образца.

3. Можно использовать две колонки, по одной на каждый детектор, чтобы в этом случае можно было судить о соотношении откликов отдельных компонентов смеси, необходим полный количественный анализ стандартной смеси.

Пример соединения неселективного [9] (пламенно-ионизационного) и селективного (пламенно-ионизационного со щелочным металлом) детекторов показан на рис. 10.24. Полученные хроматограммы показывают, что селективный детектор, поставлен-

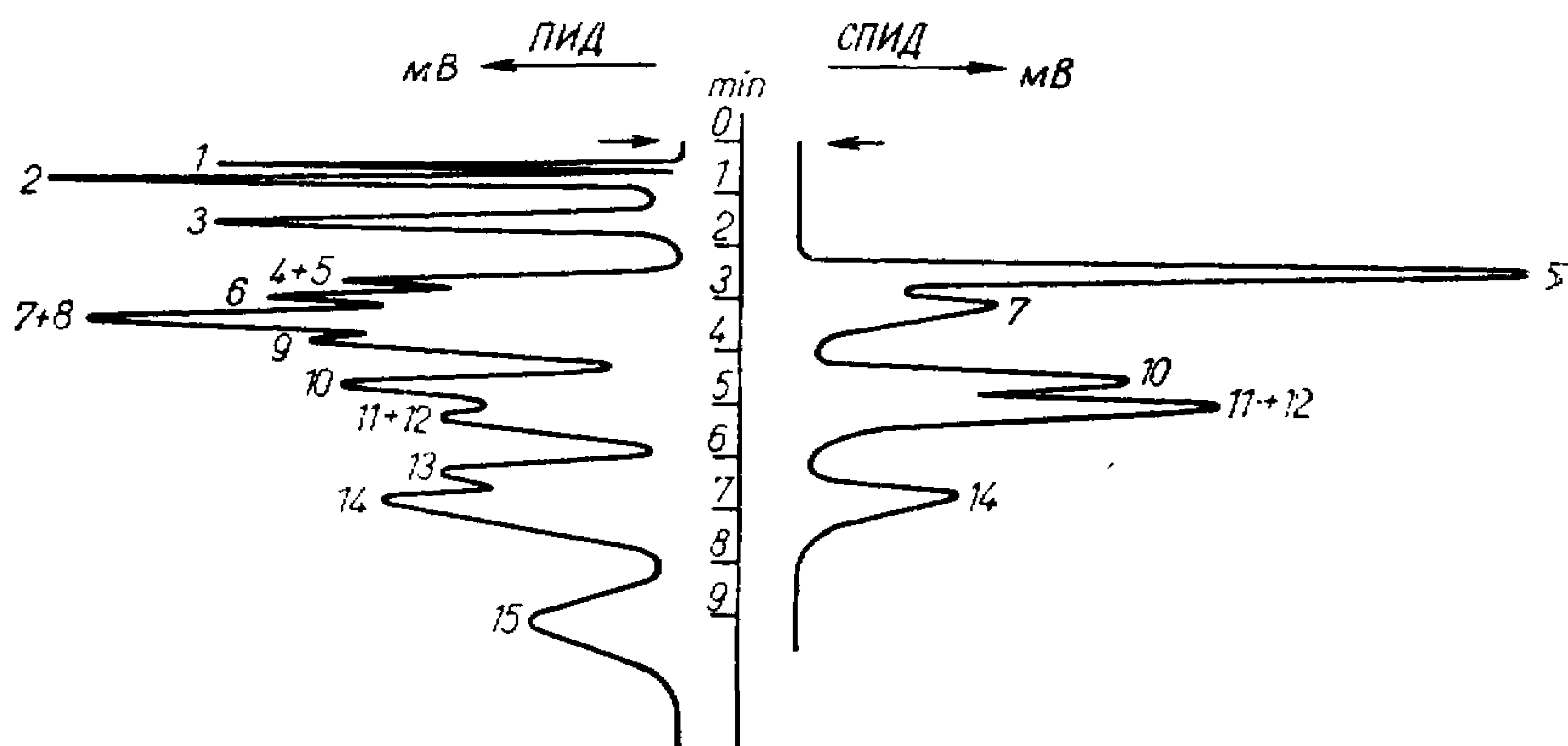


Рис. 10.24. Примеры хроматограмм, полученных при объединении пламенно-ионизационного детектора (ПИД) с селективным пламенно-ионизационным детектором (СПИД).

1 — метан; *2* — пентан; *3* — циклогексан; *4* — этилацетат; *5* — тетрахлорметан; *6* — метанол; *7* — метиленхлорид; *8* — этанол; *9* — бензол; *10* — трихлорэтилен; *11* — хлороформ; *12* — тетрахлорэтилен; *13* — толуол; *14* — 1,2-дихлорэтан; *15* — изоамилацетат.

ный вторым в серии, практически не дает отклика на углеводороды, тогда как неселективный детектор регистрирует их (вместе с галогенированными углеводородами). Это пример простого способа качественной идентификации: компоненты смеси, на которые не дает отклика селективный детектор, относятся к классу углеводородов. Однако такие существенные различия в откликах наблюдаются отнюдь не всегда. Обычное соотношение откликов селективного и неселективного детекторов лежит в пределах 10—10^3.

ЭЛЕКТРОННО-ЗАХВАТНЫЙ ДЕТЕКТОР

В этом детекторе используется реакция свободных электронов с определенными типами молекул в форме стабильных анионов [54, 55]: $AB+e=AB^-\pm$энергия или $AB+e=A+B^-\pm$энергия.

В ионизованном газе-носителе — азоте или гелии — в качестве отрицательно заряженных частиц присутствуют только элек-

троны. Вероятность рекомбинации этих электронов с положительными ионами мала вследствие их заметно различной подвижности в приложенном электрическом поле. Скорость электронов примерно в 10^4 раз больше скорости положительных ионов. Для сбора электронов необходим исключительно низкий потенциал. Если ионизованный газ содержит соединения с более высоким сродством к электрону, некоторые свободные электроны могут захватываться молекулами этого соединения с образованием отрицательных ионов, которые движутся намного медленнее сво-

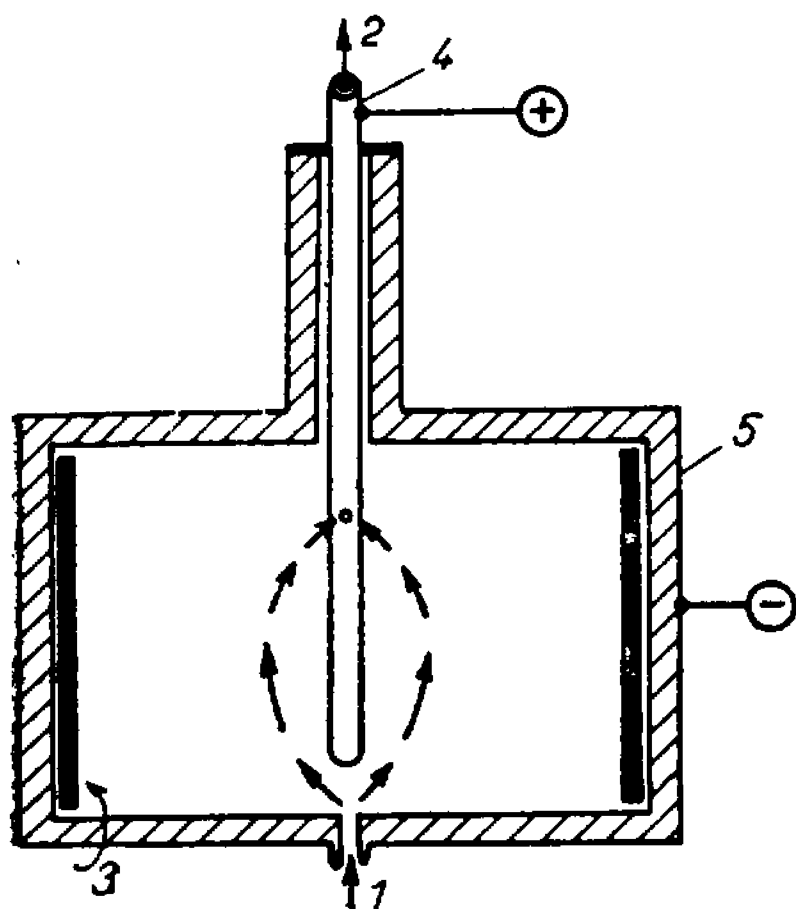


Рис. 10.25. Схема электронно-захватного детектора.

1 — ввод газа из колонки; 2 — вывод в атмосферу; 3 — источник излучения; 4, 5 — электроды.

бодных электронов. В результате вероятность их рекомбинации с катионами повышается в 10^5—10^8 раз. Следовательно, присутствие соединения, которое может захватывать электроны, приводит к уменьшению ионизационного тока детектора.

Электронно-захватный детектор обычно имеет форму цилиндрической ячейки с двумя электродами (рис. 10.25). Один из электродов изготавливают из материала, являющегося источником излучения. Чаще всего это ^{63}Ni (в этом случае детекторы можно использовать при температурах до 300—400 °С), а иногда ^{3}H, ^{226}Ra, ^{241}Ам. Электроды находятся под контролируемым напряжением. В зависимости от характера применяемого напряжения возможны два метода детектирования: непосредственный токовый и пульсационный. В первом случае ЭДС все время остается постоянной, а приложенное напряжение зависит от конструкции ячейки детектора. Если применяется пульсационный метод, напряжение пульсирует (50—30 В) с частотой 100 мкс при длительности импульса примерно 5 мкс. Очень часто в газ-носитель добавляют метан (5—10%), чтобы уменьшить энергию электронов до уровня тепловой энергии газа-носителя

путем дезактивирования столкновений; при добавлении метана подавляются некоторые аномальные сигналы.

Этот детектор дает отклик на соединения, содержащие галогены [53—56, 74], фосфор и серу [12, 24, 29, 35], нитраты [8, 53], свинец [13, 31, 55, 57] и кислородсодержащие соединения. Он детектирует также NO_2, озон и кислород [23, 53, 62, 63] и некоторые углеводороды, например азулены, стильбены, антрацен (ср. [50]), однако на большинство углеводородов отклика не дает.

ПЛАМЕННО-ИОНИЗАЦИОННЫЙ ДЕТЕКТОР СО ЩЕЛОЧНЫМ МЕТАЛЛОМ

Этот детектор является модификацией пламенно-ионизационного детектора. В нем используется отличие в ионизации в пламени в присутствии щелочного металла. Сигнал детектора превышает сигнал простого пламенно-ионизационного детектора на несколько порядков, особенно если анализируются соединения, содержащие галогены или фосфор. Щелочной металл в пламени ионизуется по реакции [70]: $A+X \rightleftarrows A^{+}+e+X$, где A — атом щелочного металла и X — молекула газа. Под каталитическим воздействием соединений, к которым детектор наиболее чувствителен (фосфор- и галогенсодержащие соединения), ионизация происходит в соответствии с реакцией $A+2H \rightleftarrows A^{+}+e+H_2$.

Схема конструкции такого детектора показана на рис. 10.26. Соль щелочного металла, нагреваемую пламенем горелки, помещают под электродами или между ними [79]. Пламенно-ионизационный детектор легко преобразовать в такой более селективный детектор, и этим часто пользуются в лаборатории. Однако нулевой сигнал детектора при этом всегда существенно увеличивается, и иногда стандартного электронного оборудования недостаточно для компенсации тока.

Конструктивно детекторы этого типа различаются главным образом методом крепления соли щелочного металла, методом нагревания и геометрией детектора. Все эти факторы влияют на чувствительность и селективность детектора. Соль металла обычно закрепляют на небольшой спирали, петле, сетке, пористом металле или пористой керамической прокладке. Иногда используется формирователь пламени (рис. 10.26), изготовленный непосредственно из соли щелочного металла, например бромида цезия [37].

В зависимости от геометрии детекторов их делят на две группы. В первую группу входят так называемые двухгорелочные детекторы (см., например, [9]), в которых две пламенно-ионизационные системы расположены одна над другой и имеют

общий вход газа. Источник щелочного металла располагают между двумя системами с тем, чтобы нижняя горелка работала как нормальный неселективный детектор, а верхняя система — как пламенно-ионизационный детектор со щелочным металлом. Типичная хроматограмма, полученная на приборе с такой горелкой, приведена на рис. 10.24. Так называемые одногорелоч-

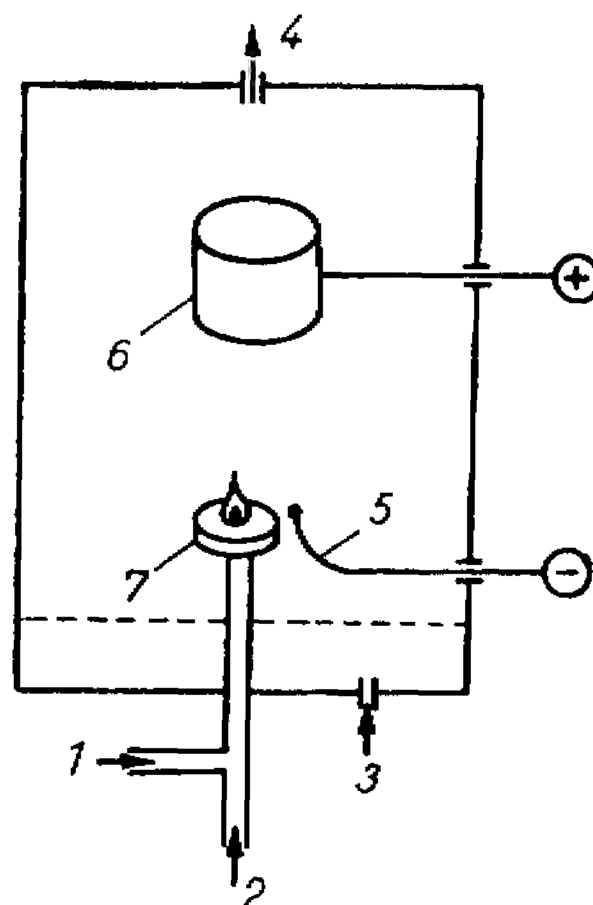


Рис. 10.26. Схема пламенно-ионизационного детектора со щелочным металлом [37а].

1 — ввод водорода; *2* — ввод газа из колонки; *3* — ввод воздуха; *4* — вывод в атмосферу; *5* — катод; *6* — собирающий электрод; *7* — подложка из соли щелочного металла.

ные детекторы относятся ко второй группе (см., например, [26]), в них соль располагается в потоке в нормальном пламенно-ионизационном детекторе.

Недостаток пламенно-ионизационного детектора со щелочным металлом — его относительно низкая стабильность. Поскольку поступление щелочного металла из источника или температура источника меняются, то меняются чувствительность и селективность детектора. Кроме того, на отклик влияет также скорость потока газа-носителя, расстояние от электрода до пламени, полярность электродов, диаметр струи, тип газа-носителя и анионы используемой соли. При использовании детектора описанного типа наибольшая чувствительность достигается при определении фосфорсодержащих соединений (10^{-12} г/с); чувствительность обнаружения серу- и азотсодержащих соединений несколько меньше (10^{-10} г/с); галогенпроизводные дают сигнал при 10^{-9} г/с. По этой причине данный детектор применяется главным образом для анализа биоцидов и гербицидов и ряда соединений подобного типа. Если проводится количественный анализ, чувствительность детектора необходимо очень часто проверять, поскольку часто она меняется за относительно короткий интервал времени (несколько часов), причем иногда даже на несколько порядков.

ДРУГИЕ СЕЛЕКТИВНЫЕ ДЕТЕКТОРЫ

Разработан ряд селективных детекторов, работающих по следующему принципу: образец адсорбируется подходящей жидкостью, которая затем анализируется кулонометрически, кондуктометрически или полярографически. Такие методы детектирования рассматриваются, например, в статьях [50, 78]. Чувствительность и селективность обнаружения в большинстве случаев зависит от правильности выбора адсорбирующей жидкости. Одной из основных проблем, возникающих при использовании этих детекторов в газовой хроматографии, является поддержание достаточной эффективности колонки в процессе адсорбции компонента в детекторе. Поэтому адсорберы изготавливаются очень малого объема с принудительной циркуляцией жидкости. Так, например, чувствительность определения кулонометрическим детектором иодсодержащих соединений равна 10^{-13}—10^{-14} моль/с.

Спектрофотометрические детекторы относятся к числу важных селективных детекторов. Пламенно-фотометрический детектор фиксирует свет определенной выбранной частоты, испускаемый пламенем. Пламенный фотометр, определенным образом отрегулированный и подключенный к выходу колонки, может служить детектором [6, 42] главным образом при анализе соединений, содержащих фосфор, галогены, серу (например, биоциды), и для селективного детектирования хелатов металлов (Mo, W, Ti, As, Zr, Rh, Cr) и т. д. Чувствительность определения фосфорсодержащих соединений может достигать 10^{-13} г/с. У эмиссионного детектора, в котором вместо пламени используется электрический разряд (обычно безэлектродный) [59], аналогичные селективность и чувствительность. Так, чувствительность определения фосфор-, серу-, бром- или хлорсодержащих соединений составляет 10^{-11}—10^{-12} г/с, а чувствительность определения иодсодержащих соединений достигает 10^{-14} г/с [59]. Спектрофотометрические детекторы в большинстве случаев стоят дороже, чем обычные селективные детекторы, например электронно-захватный детектор или даже пламенно-ионизационный со щелочным металлом, но при соответствующем выборе частоты излучения селективность обнаружения спектрофотометрическими детекторами может быть очень высокой. Иногда даже можно регистрировать сигналы при двух различных частотах и таким образом получать селективный отклик на два различных гетероатома в молекуле. Примером тому могут служить соединения, содержащие фосфор и серу. При использовании двух различных светофильтров и двух оптических путей возможна регистрация сигналов при длинах волн 526 и 394 нм. Сигнал фосфора при 526 нм в 800 раз интенсивнее,

чем при 394 нм, тогда как сигнал серы при 394 нм в 22 раза интенсивнее, чем при 526 нм [5]. Соотношение сигналов может дать информацию об относительных номерах гетероатомов в молекуле, т. е. дать какую-то информацию о составе молекулы.

10.4.4. ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ В СОЧЕТАНИИ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ И ДРУГИЕ СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

С самого начала развития хроматографии, особенно колоночной, жидкостной и плоскостной, предпринимались неоднократные попытки разработать метод однозначной идентификации фракций, полученных после хроматографического разделения. Очень важным шагом в этом направлении являются работы, показавшие возможность непосредственного сочетания газо-хроматографического и некоторых видов спектрометрического анализа. Больше всего работ посвящено разработке методики газохроматографического анализа в сочетании с ИК-спектроскопией [71, 72]. В области 2,5—15 мкм спектр удается записать за 6 с, причем полученные спектры хорошо согласуются с приведенными в каталогах спектрами, полученными по статической методике. Использование флуориметрии и УФ-спектрометрии в сочетании с газовой хроматографией оказалось не столь успешным; эта методика не получила широкого распространения, хотя в ряде работ опубликованы различные примеры ее применения [50].

В настоящее время наиболее отработана методика газо-хроматографического разделения в сочетании с масс-спектрометрическим анализом. В этом случае масс-спектрометр (простейшей и дешевой конструкции) может использоваться, во-первых, как высокоселективный детектор для регистрации хроматографических пиков, получаемых при частном значении m/e (например, 43 и 57 для парафинов от C_3 или C_4, 91 и 78 для ароматических соединений и бензола). Во-вторых, такая методика допускает регистрацию масс-спектров отдельных хроматографических пиков (или всех пиков). В этом случае получается полный спектр отдельных компонентов анализируемой смеси. Второй метод применяется чаще. Объединяя данные по характеристикам удерживания с данными масс-спектрометрии, можно наиболее эффективно анализировать сложные смеси природных соединений. Современные масс-спектрометры (особенно масс-спектрометры квадрупольного типа) позволяют регистрировать спектры за достаточно короткое время, например 0,01 с, и в достаточно широкой области значений m/e, поэтому поток газа-носителя в ходе анализа не перекрывают и эффективность колонки, подсоединенной к масс-спектрометру, не падает.

В установке, объединяющей газовый хроматограф и масс-спектрометр, очень большую роль играет конструкция устройства, с помощью которого колонку подсоединяют к источнику ионов масс-спектрометра. Источник ионов масс-спектрометра обычно работает под вакуумом (10^{-5} мм рт. ст.), эффективность колонки в таких условиях неизбежно значительно бы снизилась,

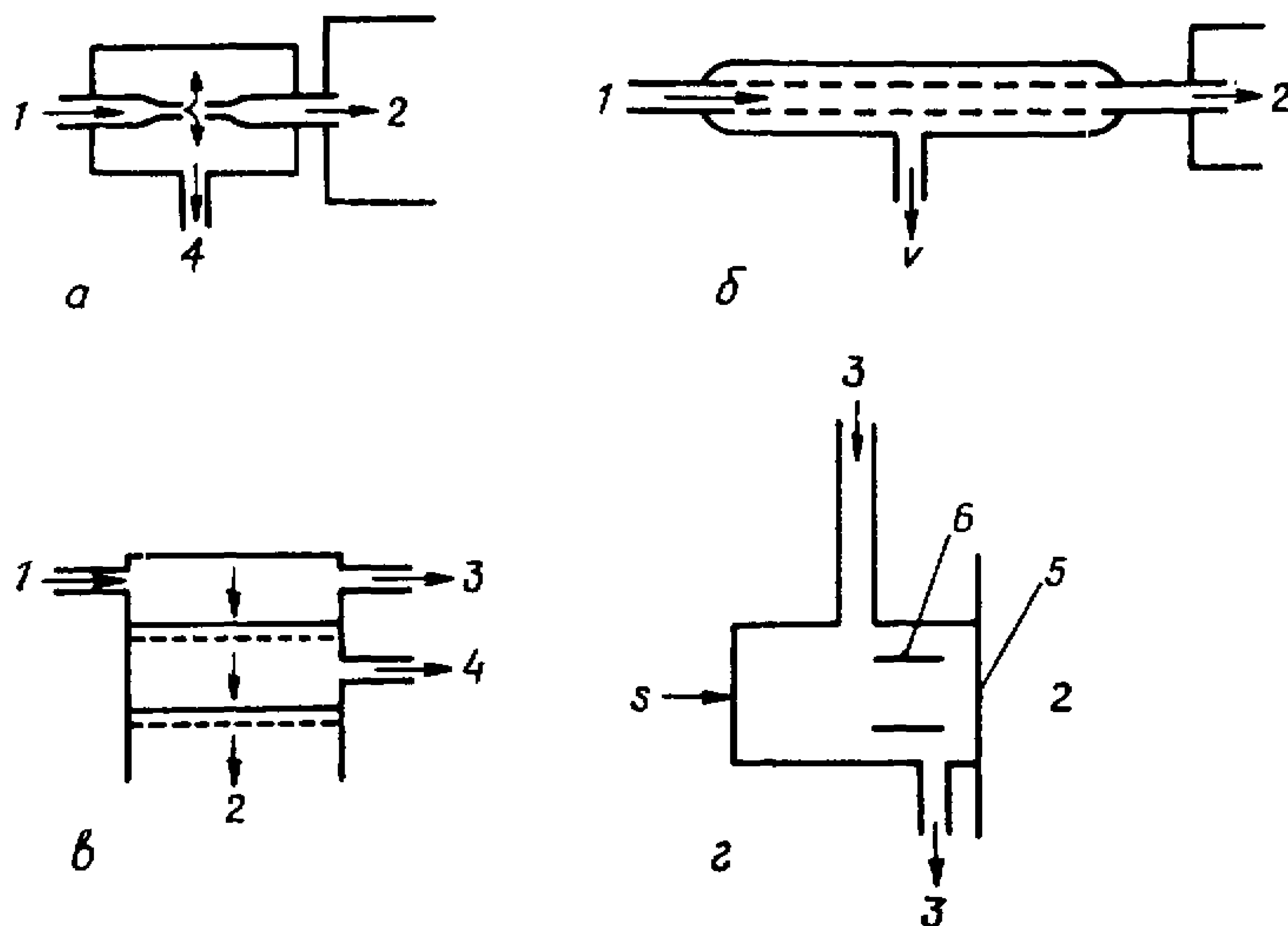


Рис. 10.27. Молекулярные сепараторы.

а — струйные сепараторы; *б* — капиллярные сепараторы; *в* — мембранные сепараторы; *г* — β-ионизационный ввод в масс-спектрометр. *1* — ввод в колонку; *2* — масс-спектрометр; *3* — газ-носитель; *4* — к вакуумному насосу; *5* — эффузионный ввод 25 мкм; *6* — источник β-излучения; *7* — ввод образца.

поэтому в большинстве современных приборов хроматографические колонки соединены с масс-спектрометром через так называемый «молекулярный сепаратор». При таком соединении давление между выходом из колонки и источником ионов можно резко понизить, в этих условиях газ-носитель (почти всегда гелий) исключается из смеси, в результате чего образец обогащается. В молекулярных сепараторах (рис. 10.27) используется различие в свойствах газа-носителя и анализируемого компонента, обусловленных различным размером их молекул [88]. Струйные сепараторы (рис. 10.27, *а*), одношаговые или многошаговые [77], изготавливают из металла или стекла. Диаметры форсунок и расстояние между отдельными форсунками выбирают такими, чтобы молекулы с малой молекулярной массой (газ-носитель) преимущественно отсасывались из сепаратора вакуумным насосом, а газ-носитель, обогащенный образцом, всасывался в источник ионов. В молекулярном сепараторе второго типа (рис. 10.27, *б*) газ-носитель диффундирует через по-

ристый материал [30] — стекло или тефлон. В молекулярном сепараторе третьего типа (рис. 10.27, *в*) используется преимущественное растворение органических молекул в разделяющей мембране и их диффузия через мембрану в источник ионов масс-спектрометра [4]. Авторы работы [38] разработали новый тип соединения, объединяющий свойства молекулярного сепаратора с преимуществами специальной ионизации в масс-спектрометре (рис. 10.27, *г*) [38]. Молекулы анализируемого вещества, покидающие колонку, облучаются β-излучением и вводятся в разделяющую часть масс-спектрометра (источник ионов отключен). Поэтому в спектре анализируемого соединения присутствуют практически только одинаково заряженные ионы с исходной молекулярной массой. Это в значительной степени упрощает идентификацию соединений и интерпретацию масс-спектрограмм. (С аналогичной целью проводится и химическая ионизация [64].)

Непосредственная чувствительность, получаемая на масс-спектрометре, обычно составляет 10^{-15}—10^{-16} г/с. В таких условиях идентификация нереальна. Для регистрации полного масс-спектра необходимо работать в области 10^{-13}—10^{-14} г/с. Объединение масс-спектрометра с газовым хроматографом сегодня один из наиболее эффективных аналитических методов. Это также область, в которой использование вычислительной техники для оценки анализов находится на высоте. Существуют компьютеризованные системы, которые помнят хроматограммы и соответствующие спектрограммы и могут выбрать соответствующее вещество из банка данных, или они могут непосредственно сравнить полученные экспериментальные данные с данными, хранящимися в библиотеке. Такое объединение нашло широчайшее применение в области медицинских анализов, анализов окружающей среды, где должно проводиться большое число сложных разделений.

10.5. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

10.5.1. ВОЗМОЖНЫЕ ИСТОЧНИКИ ОШИБОК

Прежде чем приступить к описанию методов количественной оценки хроматограмм, отметим возможные источники ошибок.

1. *Ввод образца.* Прежде всего необходимо отобрать образец, который содержал бы как жидкую, так и газообразную или твердую фазы, а сделать это достаточно сложно. Далее, во многих случаях о гомогенности материала, например нефти, природного газа и т. д., приходится судить по очень малому его образцу. При этом также возможны ошибки. И наконец, большое значение имеет методика ввода образца. Образец можно вве-

сти в хроматограф в неизмененном виде, можно предварительно его испарить, или разложить, или же перевести в то или иное производное. Неправильно выбранная методика приведет к ошибочным результатам.

2. *Адсорбция или разложение образца в хроматографе.* Количественная газовая хроматография требует, чтобы весь введенный в колонку образец вышел из нее в виде ряда пиков, соответствующих компонентам образца. Однако некоторые компоненты могут сорбироваться или разлагаться в системе ввода, колонке или детекторе. Известны случаи, когда весь введенный образец необратимо сорбировался в системе. Установить возможность такой сорбции достаточно просто: следует приготовить смесь трудно определяемого вещества с инертным углеводородом и вводить ее в хроматограф при различных разбавлениях. Если отношение площадей пиков двух соединений остается постоянным, то исследуемое соединение в хроматографе не сорбируется и не разлагается.

3. *Детектирование.* Каждый детектор дает различный отклик на различные соединения, и при проведении количественного анализа необходимо знать коэффициент чувствительности. Отклик детектора меняется также при изменении рабочих условий. Так, например, чтобы получить правильные и воспроизводимые результаты с помощью катарометра, необходимы строго постоянные поток газа-носителя, температура детектора, ток нагрева, сопротивление нити и внешнее давление.

4. *Регистрация.* Ошибки могут появляться и на стадии регистрации результатов анализа самописцем. Чтобы исключить возможность их появления, необходимо выбрать рабочий интервал, определить область линейности, скорость протяжки ленты, скорость движения пера, мертвый ход и электрический нуль. Точность измерений устанавливают с помощью стандартов.

5. *Оценка удерживания пиков.* Вероятно, наиболее ответственным моментом является преобразование хроматографических пиков в числовые данные, соответствующие составу образца. Этот вопрос мы обсудим отдельно.

6. *Расчеты.* Полученные числовые значения, соответствующие площадям хроматографических пиков, должны быть пропорциональны концентрации компонентов образца. Этот вопрос мы также рассмотрим отдельно.

10.5.2. ОЦЕНКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ КРИВЫХ

Для количественной оценки хроматограмм можно использовать либо высоту, либо площадь пиков. Выбор метода оценки зависит от вида и характера кривых и от технических возможно-

стей. Высоту пика измерить намного быстрее, чем его площадь. Однако у кривых зависимости высоты пика от количества вещества линейный участок меньше, чем у кривой зависимости площади пика от количества вещества. Кроме того, высота пика сильно зависит от рабочих условий (температуры, скорости потока газа-носителя, размера введенного образца), которые должны поэтому поддерживаться очень точно на постоянном уровне. Если применяются упакованные колонки, высоту пика

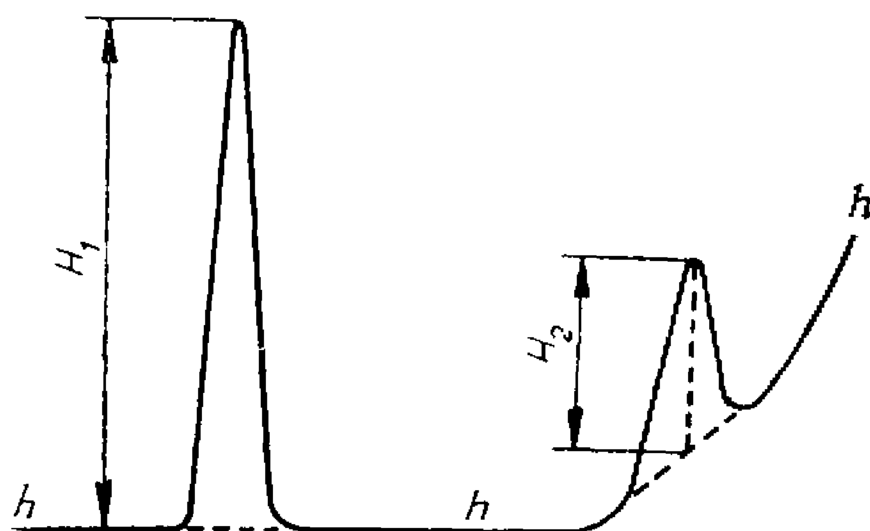


Рис. 10.28. Измерение высоты пика.

H_1, H_2 — измеренная высота; h — нулевая линия.

обычно измеряют в тех случаях, когда масса образца не достигает 10 мкг; если же анализ ведется на капиллярных колонках, высоту пика измеряют в тех случаях, когда масса образца не достигает 0,1 мкг. Высота пика измеряется по перпендикуляру от нулевой линии до максимума пика (рис. 10.28) независимо от дрейфа нулевой линии.

Поскольку изменение рабочих условий на площади пика сказывается значительно меньше, их не нужно столь тщательно поддерживать постоянными. Поэтому в настоящее время для оценки результатов разделения пользуются площадями пиков. Измеряют площади пиков следующими способами:

1. *Планиметрия.* Преимущество данного способа оценки состоит в том, что характер и форма кривой в этом случае не имеют значения. Из-за низкой чувствительности планиметра и особенностей конструкции им нельзя измерить ни слишком большие, ни слишком малые площади. Возможны также субъективные ошибки, которые тем больше, чем больше площадь. Метод трудоемок, требует много времени и менее точен, чем другие методы (ошибка порядка 4%). Воспроизводимость результатов измерений, проводимых различными исполнителями, обычно неудовлетворительна.

2. *Вырезание и взвешивание пиков.* Этот метод используется относительно редко. Как и при планиметрическом определении, форма кривой не имеет значения. Метод требует много време-

ни, но может быть достаточно точным, особенно в случае асимметричных кривых. Однако в этом случае необходимым условием является гомогенность бумаги, постоянство ее толщины и

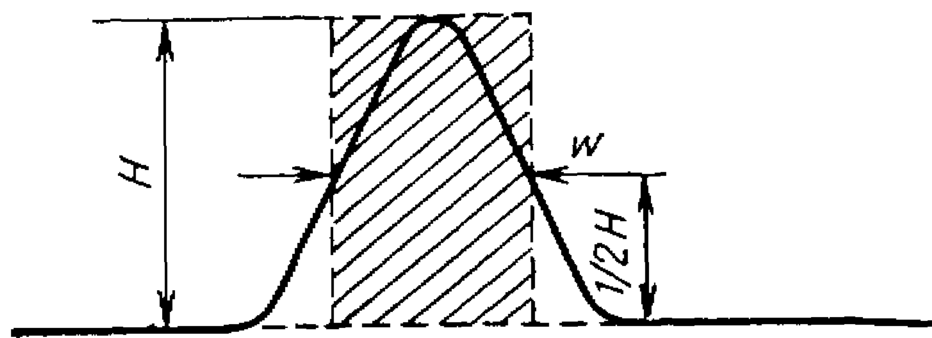


Рис. 10.29. Измерение площади как произведения высоты на полуширину (квадратура).

H — высота; *w* — ширина; полученная площадь пропорциональна площади пика.

плотности. Возможны субъективные ошибки, особенно при вырезании. Недостаток метода — необходимость разрезания хроматограмм, правда, для этого можно использовать фотокопии, при этом ошибка определения составляет примерно 2%.

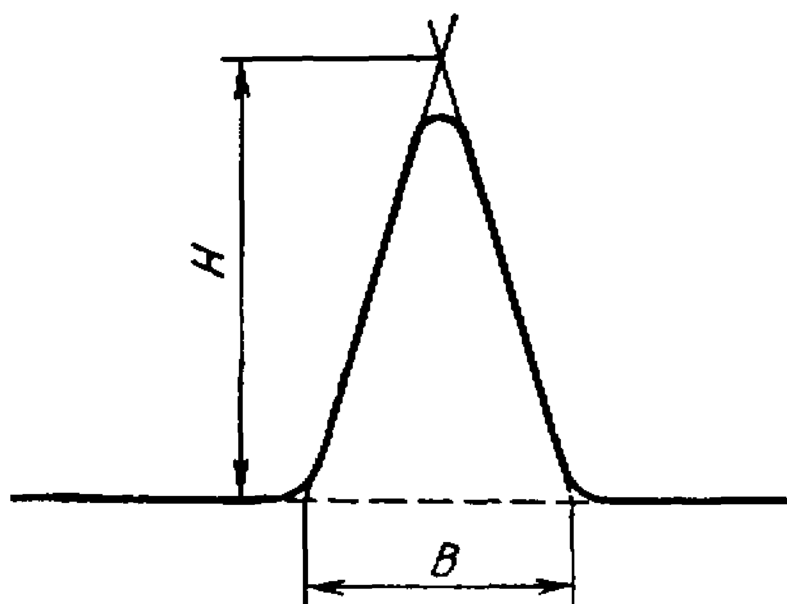


Рис. 10.30. Измерение площади триангуляционным методом.

H — высота, *B* — основание. Площадь=0,5 *B*·*H*.

3. *Определение площади пика как произведения его высоты на полуширину, или квадрирование кривой.* В принципе при использовании этого способа площадь пика определяется как площадь прямоугольника: высоту пика умножают на его ширину, измеренную на полувысоте пика (рис. 10.29). Эта методика достаточно проста и требует мало времени, но точность результатов определения зависит от формы пика. Поэтому таким способом нельзя определять площади асимметричных пиков или пиков с малой высотой и большим основанием. Ошибка определения площади симметричных пиков составляет около 2,5%.

4. *Приближение к площади треугольника, или триангуляция.* В этом случае площадь пика измеряют как площадь треугольника (рис. 10.30). Высоту измеряют от нулевой линии до точки пересечения касательных к точкам перегиба кривой. Методика относительно проста, и высоту таким способом определить лег-

ко, но иногда возникает неопределенность в определении точек перегиба. Таким способом нельзя определять площади узких и высоких и асимметричных пиков.

5. *Графическое интегрирование.* Пик делят на вертикальные полосы равной ширины, высоты которых затем складывают.

6. *Электронное или механическое интегрирование* (см. разд. 8.7).

10.5.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕ ПОЛНОСТЬЮ РАЗДЕЛЕННЫХ ПИКОВ

Чтобы упростить рассмотрение, предположим, что два компонента дают приблизительно равные пики (рис. 10.31). Определение можно проводить различными способами, например

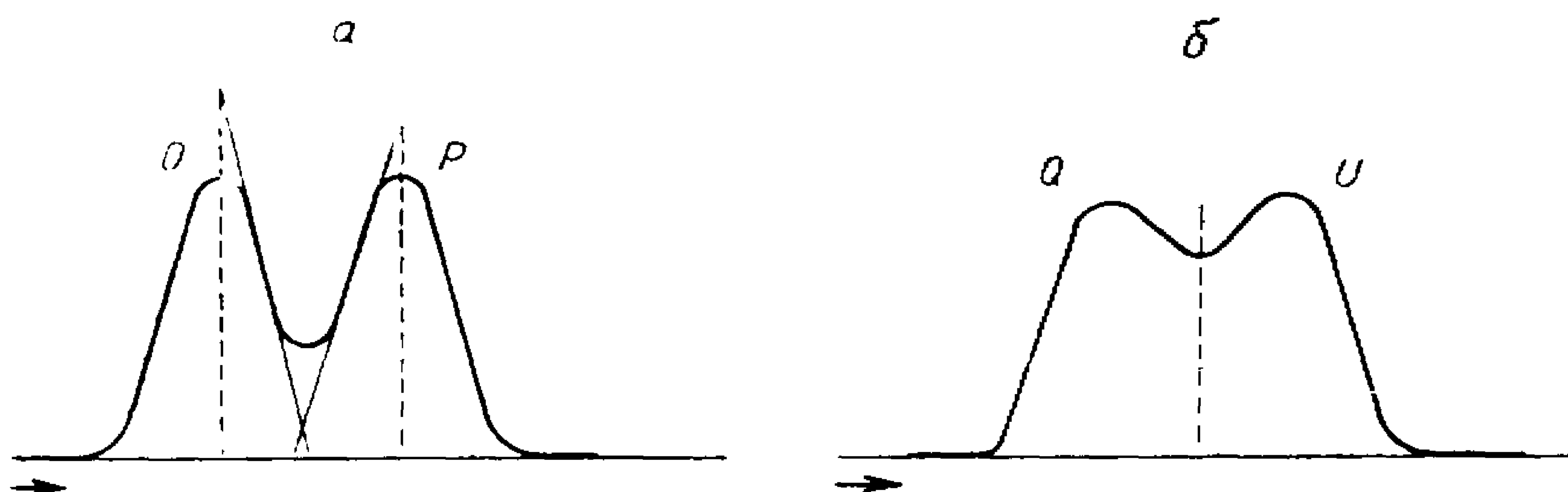


Рис. 10.31. Оценка площади не полностью разрешенных пиков.

а — измеряется высота пика или площадь пика определяется триангуляционным методом; *б* — измеряется площадь от перпендикуляра, проведенного через минимум (Q, P); Q, U — пара хроматографируемых соединений.

триангуляционным или измеряя высоты пиков. Касательные проводятся через точки перегиба для кривых *O* и *P*. Если касательная к кривой *P* пересекает нулевую линию после максимума кривой *O*, а касательная к кривой *O* пересекает нулевую линию перед максимумом кривой *P* (как показано на рис. 10.31, *а*), то применим метод триангуляции. Если перекрывание пиков настолько велико, что этот метод нельзя использовать, то высоту пика оценивают, проведя перпендикуляр из минимума между пиками к нулевой линии (рис. 10.31, *в*), и площадь обеих половинок измеряют планиметрически. Полученные таким образом результаты сравниваются с полученными для искусственно приготовленной смеси компонентов *Q* и *U*. Два перекрывающихся пика, если они симметричны, можно разделить расчетным методом или подобрать на электронном имитаторе и затем измерить планиметрически, но это требует навыка.

Если один из компонентов находится в большом избытке и если подобрать условия, позволяющие добиться полного разделения, невозможно, то провести количественное определение намного сложнее. Единственно возможный способ — отсечь меньший пик и рассчитать его площадь, например, планиметрически, как показано на рис. 10.32. После этого к образцу добавляют известное количество меньшего компонента, повторяют разделение и сравнивают обе хроматограммы.

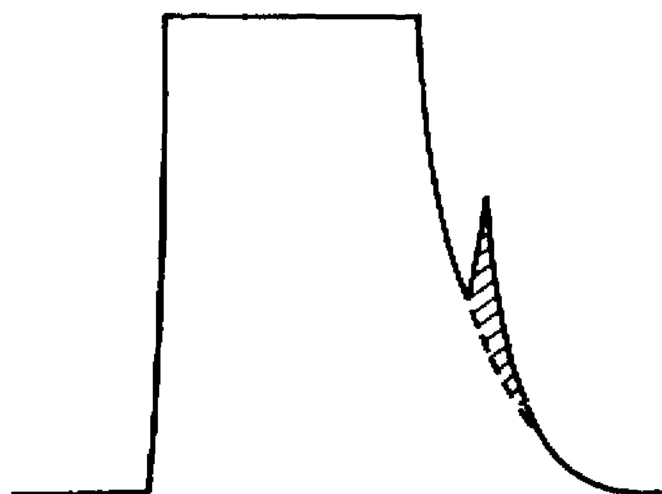


Рис. 10.32. Оценка площади пика компонента, содержащегося в следовой концентрации.

Заштрихованная площадь измеряется планиметром и сравнивается с площадью добавленного стандарта.

10.5.4. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ХРОМАТОГРАММ

Хроматограммы можно количественно оценить либо непосредственно, либо с помощью некоторых видов калибровок.

1. *Прямой метод, или нормализация.* Этот метод можно применять только в тех случаях, когда все компоненты смеси элюируются из колонки и детектор дает линейные и воспроизводимые данные с одинаковой чувствительностью для всех компонентов. Данным методом можно определить химически подобные соединения, например *о*- и *п*-ксилол, используя в качестве детектора катарометр, а в качестве газа-носителя — водород или гелий. Оценить таким способом хроматограмму несложно (рис. 10.33), и сделать это можно достаточно быстро.

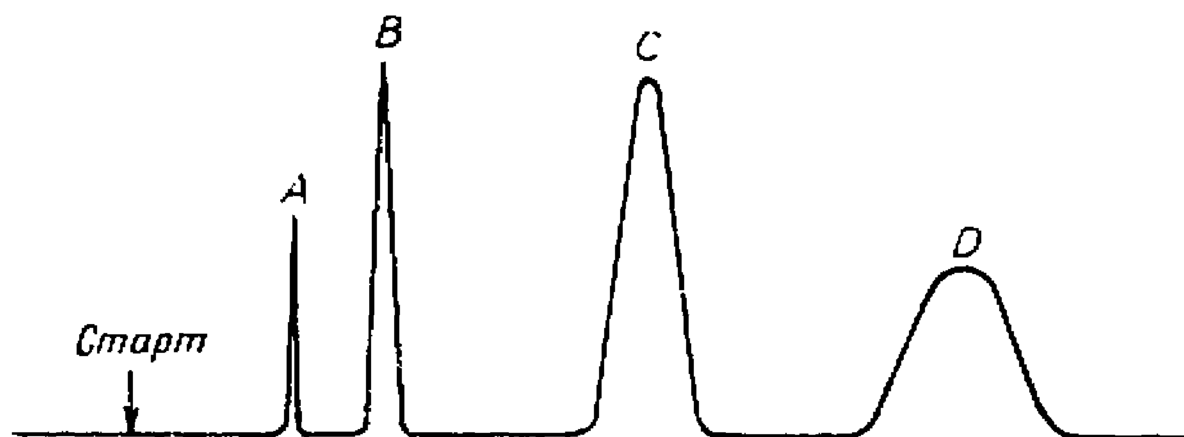


Рис. 10.33. Нормализация площади.

A, B, C и D — площади, соответствующие отдельным компонентам; сумма этих площадей составляет 100%.

$$A = [A/(A+B+C+D)] \cdot 100\% \qquad (10.50)$$

где A, B, C, D — площади пиков.

Площади, соответствующие отдельным компонентам, не всегда пропорциональны их процентному содержанию, другими словами, различные компоненты могут давать различные сигналы, поэтому необходимо определять поправочные коэффициенты для каждого из них. Найденные поправочные коэффициенты можно использовать для расчета процентного состава смеси. Поскольку принципы действия различных детекторов различаются, необходимо определять поправочные коэффициенты для каждого детектора отдельно. Для расчета процентного содержания отдельного компонента применяется следующее соотношение:

$$A = [(\text{Площадь } A/F_A)/\Sigma\,(\text{Площадь/коэффициент})]\cdot 100\% \qquad (10.51)$$

2. *Метод расчета поправочных коэффициентов для пламенно-ионизационного детектора.* Приготавливают калибровочную смесь соединений A, B, C и D известной массы и после разделения измеряют площади, соответствующие отдельным компонентам. Далее рассчитывают отношение площадей и масс каждого компонента, одно из отношений принимают за стандартное и все поправочные коэффициенты приводят к этому значению, т. е. поправочные коэффициенты для других соединений получают делением их отношений на отношение для стандарта (поправочный коэффициент для стандартного соединения принимают равным единице). Следовательно, полученные коэффициенты являются относительными.

3. *Метод расчета поправочных коэффициентов для катарометра.*

Поправочные коэффициенты для катарометра можно рассчитывать так же, как для пламенно-ионизационного детектора. Однако можно также пользоваться так называемыми массовыми коэффициентами. Площадь пика умножают на массовый коэффициент и таким образом получают исправленное значение площади соответствующего компонента. Полученные таким способом значения для всех компонентов нормализуются, и концентрация каждого вещества рассчитывается в процентах. Чтобы получить массовый коэффициент компонента, делят его молекулярную массу на относительный мольный отклик (отношение отклика каждого компонента к отклику одного выбранного соединения, который принимается равным 100).

4. *Метод абсолютной калибровки.* В колонку вводят известное количество вещества и рассчитывают площади полученных хроматографических пиков. По полученным данным строят калибровочную кривую зависимости площади пика от соответствующего количества вещества (рис. 10.34). Калибровочная кри-

вая должна быть линейной и должна проходить через начало координат. Собственно анализ проводят следующим образом: вводят известное количество анализируемой смеси, устанавливают площади пиков отдельных компонентов, по калибровочной кривой определяют соответствующее количество каждого ком-

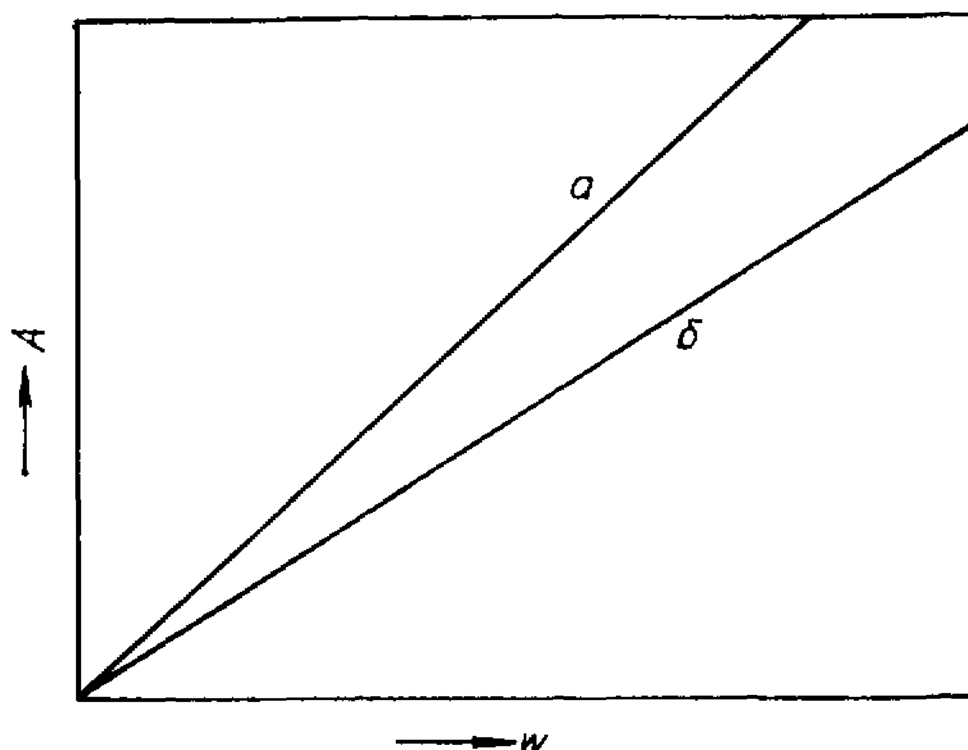


Рис. 10.34. Калибровочная кривая, используемая в методе абсолютной калибровки.

Зависимость площади (*A*), ограниченной кривой элюирования, от массы (*w*) хроматографируемых соединений (*а*, *б*).

понента и переводят его в массовые проценты в соответствии с уравнением

$$A = \frac{\text{площадь } A \cdot \text{г/площадь}}{\text{г (введенное количество)}} \cdot 100\% \qquad (10.52)$$

Метод абсолютной калибровки имеет ряд недостатков. В частности, необходимо точно определять массу вводимого в колонку образца, условия разделения должны быть строго постоянными. Вся процедура занимает довольно много времени.

5. *Метод внутреннего стандарта.* Приготавливают смеси, содержащие чистый анализируемый компонент и внутренний стандарт в различных соотношениях, хроматографируют их, определяют площади полученных пиков и строят калибровочную кривую (рис. 10.35) зависимости отношения площадей пиков от отношения масс компонентов и стандарта. Анализ проводят следующим образом: известное количество внутреннего стандарта добавляют к известному количеству образца и смесь хроматографируют, измеряют площади пиков, рассчитывают их отношение и по калибровочной кривой определяют соотношение масс стандарта и анализируемого компонента. Поскольку коли-

чество добавленного стандарта известно, содержание компонента можно рассчитать из отношения. Например, к 10 мл образца добавлено 5 мл раствора внутреннего стандарта с концентрацией 50 мкл/мл. Найденное соотношение площадей равно 8, соответствующее соотношение масс, найденное по калибровочной кривой, равно 7. Полное количество стандарта в 5 мл составляет 250 мкг, следовательно, в исходной смеси содержится 7·250=1750 мкг определяемого компонента.

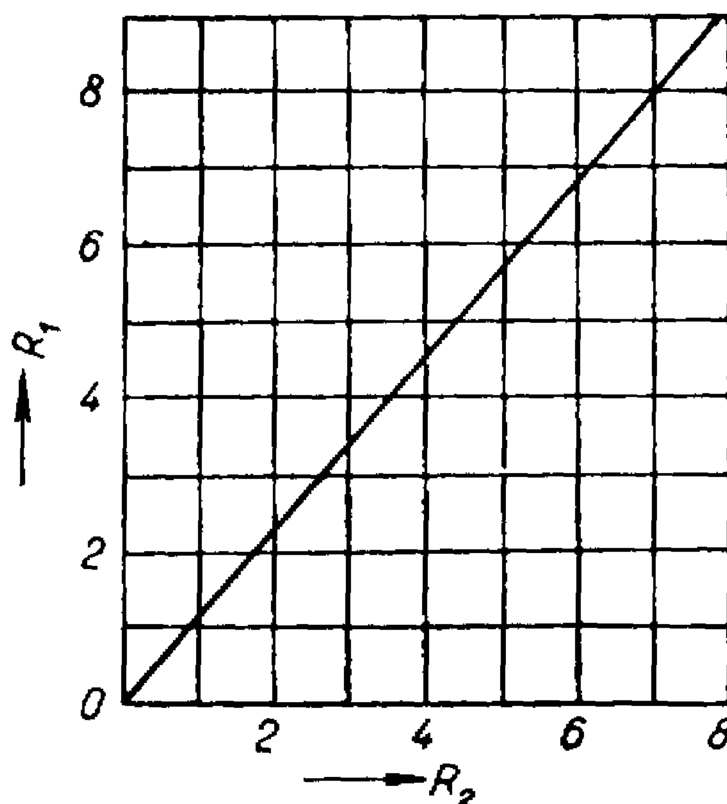


Рис. 10.35. Калибровочная кривая, используемая в методе внутреннего стандарта.

Зависимость соотношения площадей (R_1) пиков анализируемого соединения и стандарта от соотношения их масс (R_2) [59а].

Метод внутреннего стандарта имеет следующие преимущества: не нужно точно измерять количество вводимого образца, не нужно определять величину отклика детектора или поддерживать ее строго постоянной, поскольку определяются не абсолютные величины, а их отношение. Основной недостаток данного метода — трудность подбора подходящего внутреннего стандарта. Пик внутреннего стандарта должен быть полностью отделен от пиков других соединений, но в то же время он должен располагаться достаточно близко от пика определяемого соединения, концентрация стандарта должна быть приблизительно такой же, как и концентрация определяемого компонента, и наконец, стандарт должен быть структурно похож на анализируемое соединение. В случае более сложных смесей можно добавлять два и более внутренних стандарта. Метод внутреннего стандарта применяется не только в газовой хроматографии.

6. *Метод стандартной добавки.* Этот метод аналогичен описанному выше. Он отличается лишь тем, что добавляемый стандарт является одним из компонентов смеси. Этот метод используется главным образом в тех случаях, когда невозможно, например из-за плохого разрешения, подобрать какое-либо другое соединение.

10.6. ПРОГРАММИРОВАНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ

10.6.1. ПРИЧИНЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Программирование температуры, или контролируемое изменение температуры колонки в процессе анализа, используется для улучшения, упрощения и ускорения разделения и идентификации компонентов образца. Этот метод очень удобен при анализе сложных смесей, содержащих соединения с самыми раз-

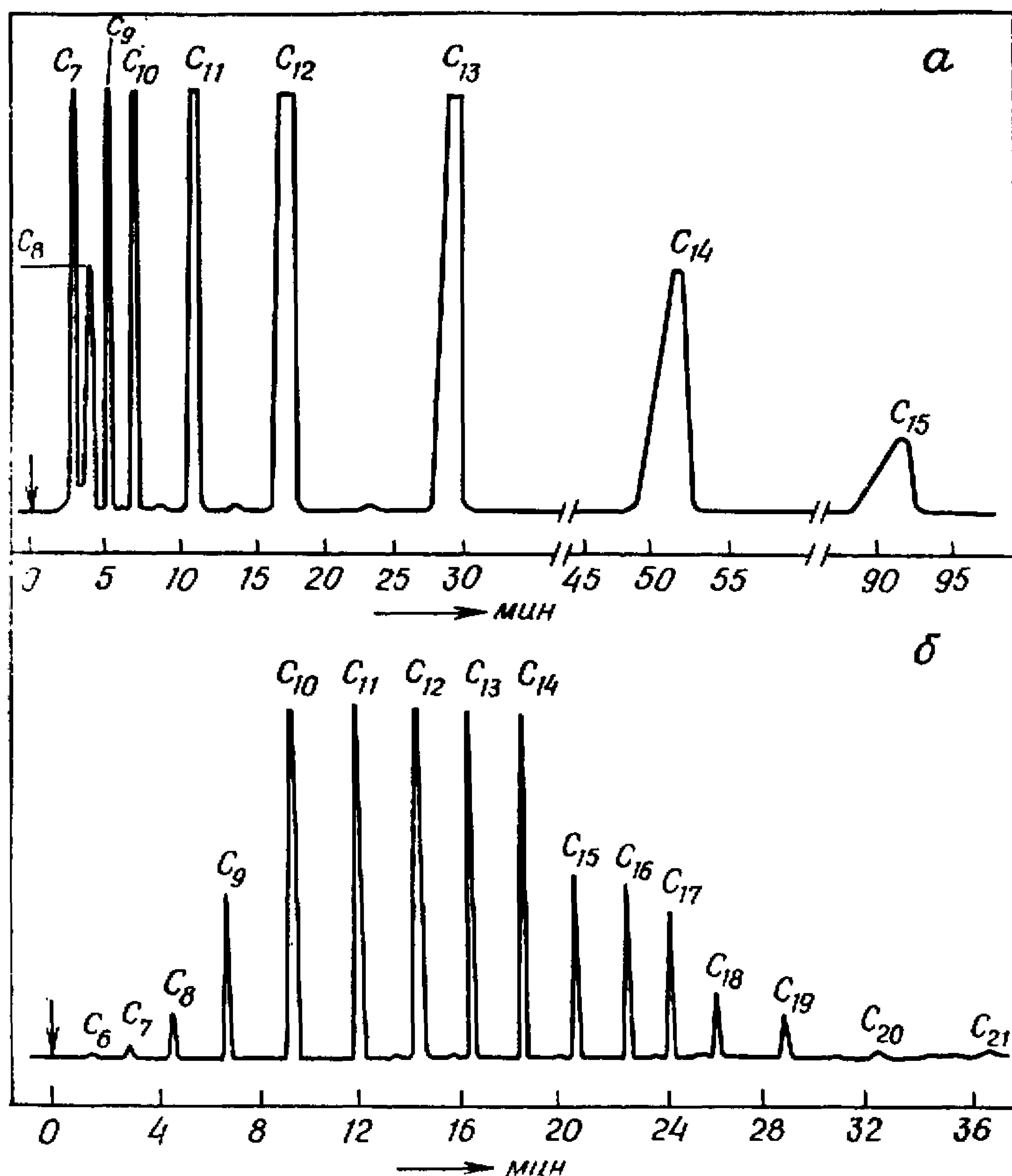


Рис. 10.36. Хроматограммы смеси углеводородов, полученные в изотермическом режиме при 150 °С (*а*) и в условиях программированного подъема температуры (*б*) с 50 до 250°С (8 °С/мин) [59а].

личными температурами кипения. На рис. 10.36 сравниваются хроматограммы одной и той же смеси, полученные на одной колонке при изотермическом разделении и разделении с программированием температуры. При изотермическом режиме

хроматографирования компонентов с низкими температурами кипения дают узкие пики, которые следуют один за другим, пики компонентов с высокими температурами кипения размыты, в ряде случаев их площадь вообще нельзя измерить. При программировании температуры разделение вначале можно вести при низких температурах, с тем чтобы первые компоненты смеси хорошо разделялись, а затем поднять температуру в колонке. В этом случае высококипящие компоненты также элюируются в виде узких пиков и длительность анализа сокращается. Программирование температуры применяется преимущественно для анализа смесей компонентов с интервалом температур кипения 100 °С и выше.

10.6.2. МЕТОДИКИ И ПРИМЕНЕНИЕ

При использовании программирования температуры должны выполняться некоторые условия. Так, например, устройство для ввода пробы, колонка и детектор должны быть расположены отдельно с тем, чтобы их температуру можно было регулировать

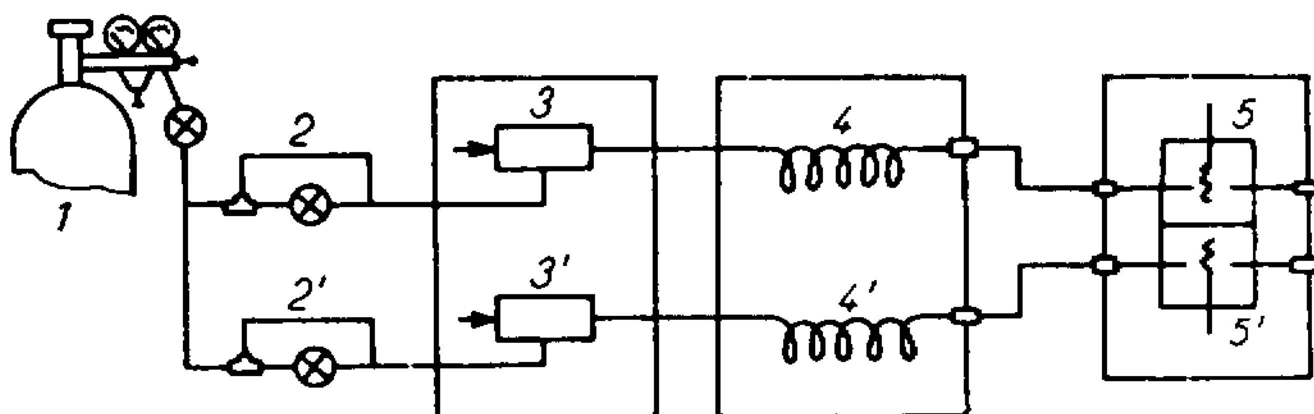


Рис. 10.37. Схема двухколоночной хроматографической установки.

1 — источник газа-носителя; *2, 2'* — регуляторы потока газа-носителя; *3, 3'* — системы ввода; *4, 4'* — колонки; *5, 5'* — детекторы.

независимо. Изменение температуры в процессе анализа в устройстве для ввода пробы и в детекторе нежелательно, а иногда и недопустимо, особенно для катарометра, который очень чувствителен к температурным изменениям. Программирование должно проводиться с точностью и воспроизводимостью 1 °С/мин в области от 0,25 до 20 °С/мин. Эти условия должны выполняться, если идентификация соединений проводится по времени элюирования. Используемая неподвижная фаза должна быть стабильной даже при максимальной рабочей температуре. Если концентрация неподвижной фазы в газе-носителе достигнет порядка 1 мкг/моль, то наблюдается заметный сдвиг нулевой линии. Влияние летучести неподвижной фазы устраняется либо соответствующим выбором ее, либо использованием двух колонок (рис. 10.37). Обе колонки содержат одинаковое количество неподвижной фазы, одна из колонок применяется как рабочая, а

другая как сравнительная. Сигнал, поступающий из сравнительной колонки, вычитают из сигнала, поступающего из рабочей колонки; это позволяет исключить влияние летучести неподвижной фазы. В двухколоночной системе в качестве детектора целесообразнее применять катарометр, а не пламенно-ионизационный детектор. На рис. 10.38 показаны хроматограммы одной

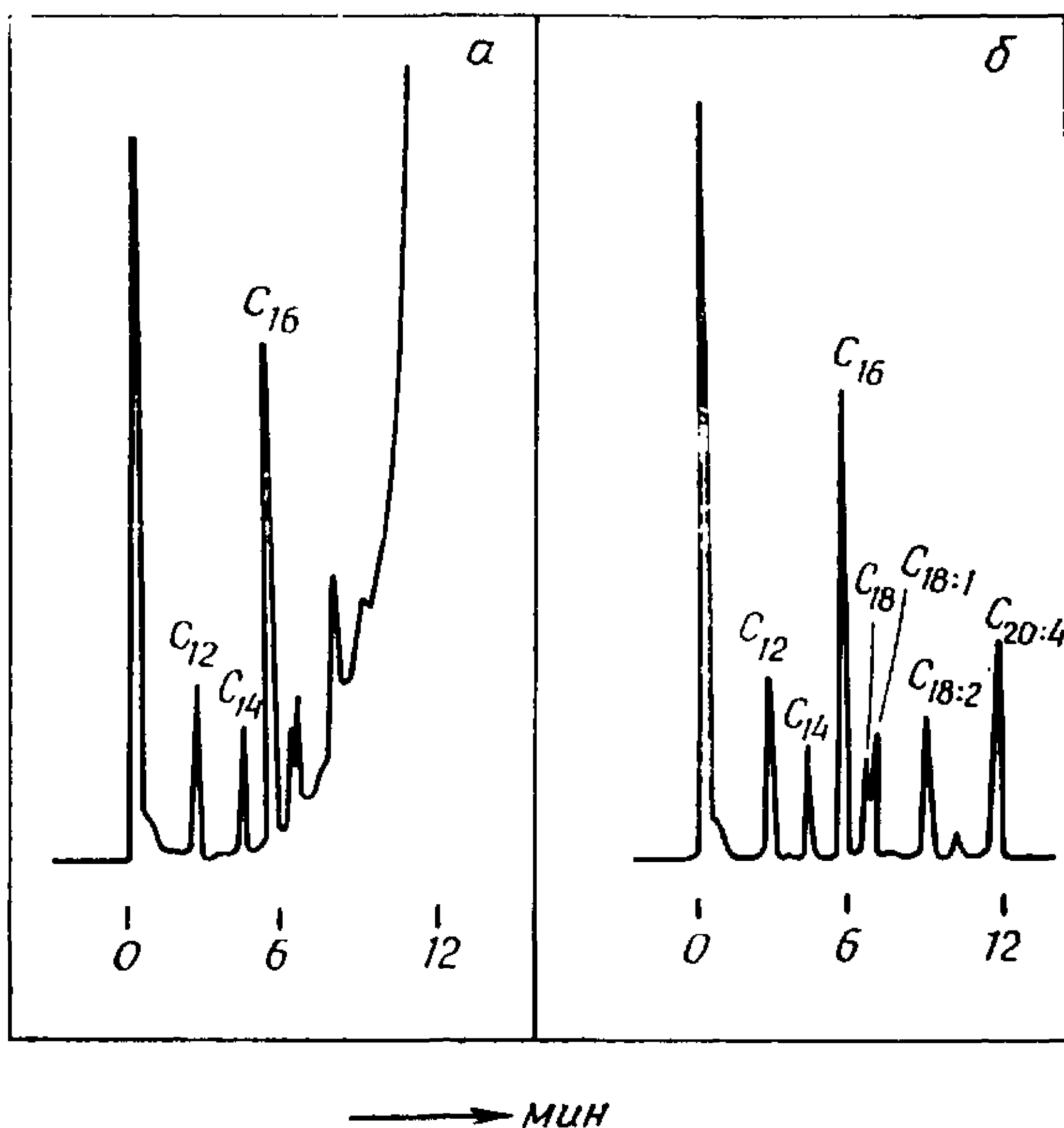


Рис. 10.38. Анализ метиловых эфиров жирных кислот с программированием температуры на хроматографической установке с одной (*а*) и с двумя (*б*) колонками [59а].

и той же смеси, полученные при программировании температуры на одно- и на двухколоночной системе.

Опыт работы с программированием температуры подсказывает, например, что длина упакованной колонки должна составлять 2—3 м, начальная температура должна быть несколько ниже, чем температура кипения самого низкокипящего компонента. Скорость подъема температуры должна удовлетворять двум требованиям: должна обеспечивать хорошее разделение при приемлемой скорости анализа. При малой скорости нагрева высококипящие компоненты элюируются очень медленно, в результате чего на хроматограмме могут появляться нерегистрируемые пики. При быстром нагреве понижается эффективность разделения. Обычная скорость нагрева для колонки размером 2—3 м×2—3 мм составляет 1—4 °С/мин. Скорость потока газа-носителя влияет на длительность элюирования значительно сла-

бее, чем температура. Конечная температура разделения должна быть близка к температуре кипения наиболее высококипящего компонента.

Газовая хроматография с программированием температуры дает наиболее хорошие результаты при анализе смесей компонентов с широким диапазоном температур кипения, при изучении состава сложных смесей природных соединений, при разделении сильно сорбирующихся соединений в газо-адсорбционном варианте хроматографии и, наконец, при выявлении следов высококипящих компонентов в различных смесях.

10.7. ДРУГИЕ ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

10.7.1. ИЗМЕРЕНИЕ ИЗОТЕРМ АДСОРБЦИИ

Для расчета изотерм адсорбции по хроматографическим данным предложено несколько методов. Наибольшим предпочтением пользуется метод, в котором изотермы сорбции рассчитываются по кривым десорбции [27, 33]. Этот метод можно применять, если диффузионные эффекты сведены к минимуму и адсорбционное равновесие устанавливается достаточно быстро. Разделение в этом случае проводят следующим образом: непрерывный поток элюента вводят при заданной температуре в колонку до полного ее насыщения. После этого через колонку пропускают чистый газ-носитель, который элюирует адсорбированное вещество. Снижение концентрации адсорбата в газе-носителе вплоть до его полного исчезновения регистрируется детектором. Изотерму адсорбции рассчитывают, исходя из формы кривой десорбции. На рис. 10.39 показана типичная хроматограмма, представляющая изотерму Ленгмюра. Концентрация сорбата в газе показана как функция времени. Если оба вышеуказанных условия выполняются, фронт адсорбции имеет четкую форму, тогда как ветвь десорбции размыта. Если известно время обрыва фронта адсорбции, то количество адсорбата c_0 можно определить: оно пропорционально площади ABDO. Десорбционную ветвь кривой можно использовать для расчета количества адсорбированного вещества при концентрациях от 0 до c_0:

$$x = (n\bar{c} + yc)/m, \tag{10.53}$$

где x — количество десорбированного вещества при концентрации c (точка G на рис. 10.39), ммоль/г; n — число молей чистого газа-носителя, прошедшего через колонку после прерывания потока сорбата до выхода данной концентрации. Это соответствует количеству газа-носителя, прошедшего через колонку за

интервал $H—E$ (рис. 10.39); $\bar{c}$ — концентрация адсорбата в точке G, моль/моль газа-носителя; m — количество адсорбента, г; $y\bar{c}$ — количество адсорбата, оставшееся в колонке при концентрации адсорбата $\bar{c}$ (оно пропорционально площади GHJ).

Преимущество данного метода заключается в том, что одна десорбционная кривая, полученная за один эксперимент, дает такое число точек, которое достаточно для построения изотермы адсорбции. Кроме того, этот метод применим при низких кон-

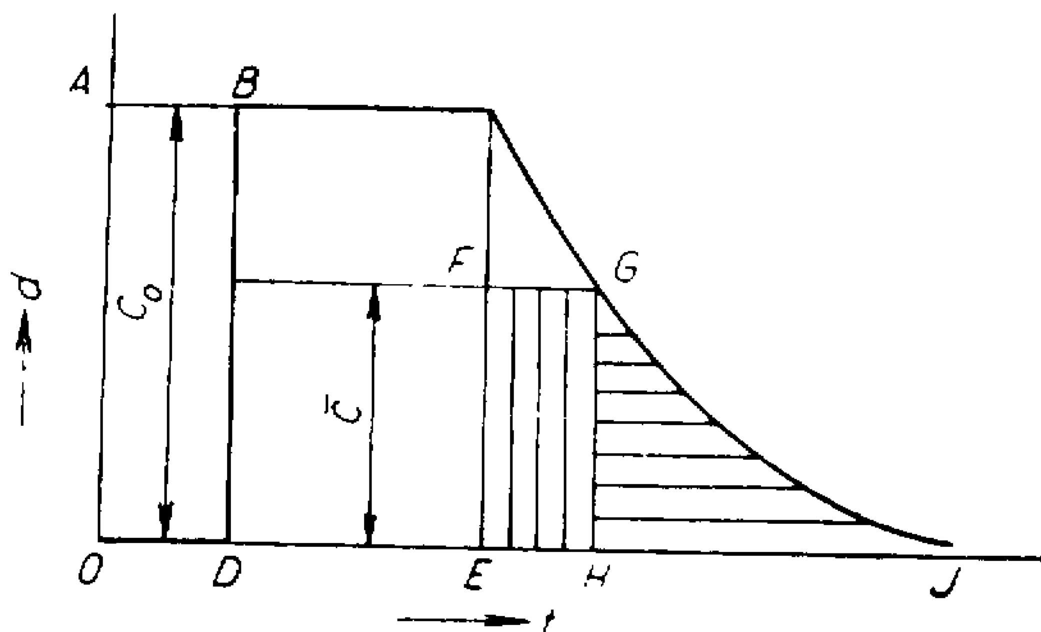


Рис. 10.39. Десорбционная хроматограмма в эксперименте Грегга и Стока [33].

d — отклонение детектора; t — время; C_0 — количество адсорбата, пропорциональное площади $ABDO$; $\bar{c}$ — концентрация адсорбата в точке G; площадь $EFGH$ соответствует произведению $n\bar{c}$, а площадь GHJ — произведению $y\bar{c}$ [см. уравнение (10.53)].

центрациях. Однако, чтобы можно было провести соответствующие расчеты, необходимо знать площадь под ниспадающей ветвью хроматограмм. Следовательно, этот метод непригоден при низких концентрациях полярных адсорбатов, адсорбированных на активных носителях, где ниспадающая ветвь асимптотически приближается к нулевой линии. В других описанных в литературе методах расчета изотерм адсорбции* используется фронтальный анализ [43], вытеснительная методика [40] и т. д. [17].

10.7.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕПЛОТЫ АДСОРБЦИИ

Метод определения теплоты адсорбции на основании хроматографических данных описан в ряде работ [2]. При определении теплоты адсорбции используется уравнение

$$k = t'_R u/L, \qquad (10.54)$$

---

* Возможность изучения адсорбции хроматографического вещества на поверхности твердого носителя рассматривается в статье Березкина В. Г. [Журнал ВХО им. Д. И. Менделеева, 25, 625 (1980)]. — *Прим. ред.*

где k — константа равновесия адсорбции (отношение числа молекул, адсорбированных на 1 см^2 адсорбента, к числу молекул, содержащихся в 1 см^3 газовой фазы, в условиях равновесия); t'_R — исправленное время удерживания, соответствующее максимуму пика (с); u — линейная скорость газа-носителя в пустой колонке (см/с); L — длина упакованной колонки, см. Как указано в работе [32], константу k можно рассматривать как константу адсорбционного равновесия, и при выполнении подходящего замещения можно получить следующее уравнение:

$$\lg {}^{pT}t_R = (-\Delta H/2{,}203R)\,(1/T_c) + a, \qquad (10.55)$$

где

$$^{pT}t_R = t'_R\,(T_c/T_f)\,^3/_2\,[(p_i/p_0)^2 - 1]/[(p_i/p_0)^3 - 1] \qquad (10.56)$$

где $^{pt}t_R$ — исправленное время удерживания, с; ΔH — изменение энтальпии адсорбции, кал/моль; R — газовая постоянная, кал·моль$^{-1}$·град$^{-1}$; T_c — температура колонки, К; T_f — температура расходомера, К; p_i — давление на входе в колонку, мм рт. ст.; p_0 — давление на выходе из колонки, мм рт. ст. Константа a является функцией энтропии адсорбции, размеров колонки и скорости потока газа-носителя. Если эти факторы поддерживаются постоянными, то зависимость логарифма исправленного объема (времени) удерживания от величины, обратной абсолютной температуре колонки, имеет вид прямой. Ее наклон пропорционален теплоте адсорбции ΔH. В более поздней работе [2] расчеты проводились по уравнению

$$\lg {}^{pT}V_N = (-\Delta H/2{,}303RT) + a, \qquad (10.57)$$

где $^{pT}V_N$ — исправленный объем удерживания, мл/г. При построении зависимости логарифма этой величины от обратной температуры получают аналогичную кривую, по наклону которой можно рассчитать теплоту адсорбции.

Соответствующие измерения проводятся на тех же установках, которые используются для разделения. Метод измерения состоит в регистрации характеристик удерживания соединений в зависимости от установленной температуры.

10.7.3. ИЗМЕРЕНИЕ УДЕЛЬНОЙ ПОВЕРХНОСТИ АДСОРБЕНТА

Для измерений удельной поверхности адсорбентов и твердых веществ в некоторых случаях применяется метод, разработанный Нельсеном и Эггертсеном [65] и называемый «хроматографическим методом динамической десорбции». Поток газа-носителя (гелий или водород), содержащий адсорбат (чаще всего азот, реже бутан, бензол и т. д.) в концентрации от 5 до 30%, прохо-

дит через адсорбент ($\sim$0,05—1 г), помещенный в U-образную трубку. Адсорбционное равновесие на поверхности устанавливается при комнатной температуре. Трубку с адсорбентом после этого охлаждают до температуры кипения жидкого азота (—195,8 °С), опуская ее в сосуд Дьюара. Вследствие адсорбции азота на поверхности адсорбента концентрация его в газе-носителе понижается. Это понижение фиксируется катарометром. После извлечения трубки из сосуда Дьюара азот десорбируется с поверхности адсорбента и концентрация его в газе-носителе увеличивается. Самописец записывает в это время пик, направленный в противоположную по сравнению с адсорбционным пиком сторону. После калибровки по газообразному азоту отклика детектора можно рассчитывать объем адсорбированного азота (равный объему десорбированного азота) либо по одному, либо по обоим пикам. Зная число молекул и площадь, занимаемую одной молекулой адсорбата (для азота 16,2 Å^2), можно рассчитать удельную поверхность адсорбента. Расчет основан на теории Брунауера, Эммета, Теллера (БЭТ) [7], основное используемое уравнение записывается следующим образом:

$$[p_r/V(1-p_r)] = 1/V_mC + [(C-1)/V_mC]\,p_r. \qquad (10.58)$$

где p_r — относительное давление или сотая часть объемной концентрации адсорбата (обе величины безразмерные); V — объем адсорбата, адсорбированного при данных условиях, мл; V_m — объем адсорбата, необходимый для покрытия поверхности адсорбента мономолекулярным слоем, мл; C — константа БЭТ. Если V определяется экспериментально по крайней мере для двух различных (и известных) значений p_r, то значения C и V_m можно получить графическим решением уравнения (10.58). Для азота в качестве адсорбата $C \gg p_r$, поэтому значение V_m можно рассчитать по данным одного эксперимента [36], если упростить уравнение (10.58) и пренебречь членом $1/C$:

$$V(1-p_r) = V_m, \qquad (10.59)$$

Величину удельной поверхности S рассчитывают по уравнению

$$S = (V_m \sigma N/22{,}4g)\,10^{-20}\ \text{м}^2/\text{г}, \qquad (10.60)$$

где g — масса адсорбента, г; N — число Авогадро и σ — поверхность, занимаемая одной молекулой адсорбата, Å^2.

Удельную поверхность адсорбентов измеряют либо на обычном хроматографе с детектором по теплопроводности, приспособленном для подсоединения к нему U-образных трубок с адсорбентом, либо на специально смонтированной из отдельных элементов установке (рис. 10.40) [45]. Смесь азота и гелия (или азота и водорода) из баллона *1* проходит через ловушку *2* в установку *3*. С помощью регулятора давления *5* в обеих ветвях

устанавливают одну и ту же скорость газа (0,25—1,0 мл/с). Газ проходит через систему ввода *6*, используемую для калибровки прибора газообразным азотом, в измерительную часть с U-образной трубкой *7* (диаметр 5 мм, длина 10 см), содержащей исследуемый образец. Поток газа-носителя проходит через колонку *8*, упакованную активным углем, для компенсации объемных изменений, вызванных охлаждением или нагреванием ад-

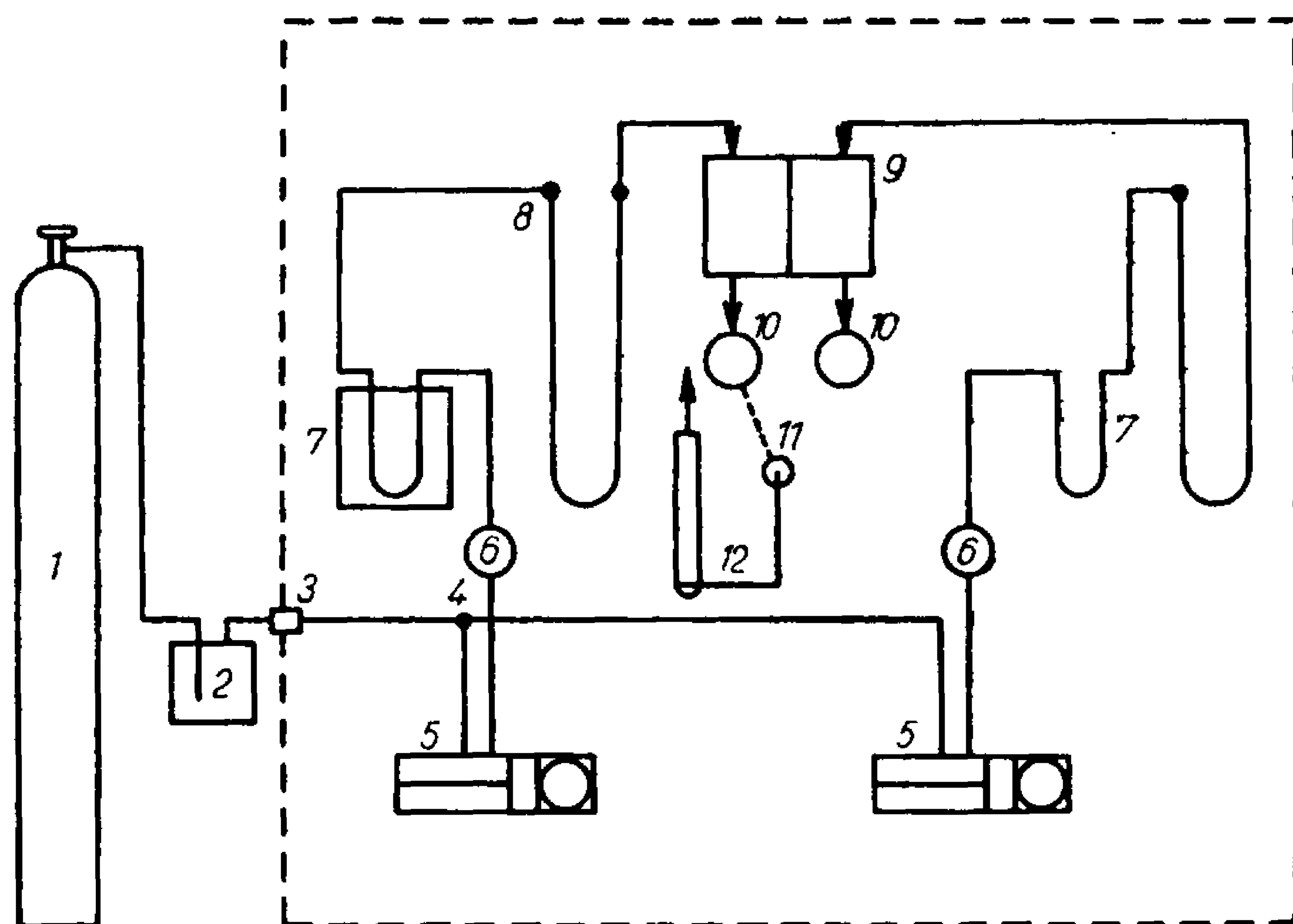


Рис. 10.40. Установка для измерения удельной поверхности адсорбента.
1 — баллон со сжатым газом; *2* — ловушка; *3* — соединительное устройство; *4* — *Т*-образная трубка; *5* — регулятор потока газа-носителя; *6* — устройство для ввода пробы; *7* — U-образная трубка; *8* — стабилизационная колонка; *9* — катарометр; *10*, *11* — соединения; *12* — расходомер.

сорбента. Газ, покидающий колонку, поступает в детектор *9*. Как только в системе установится равновесие, т. е. нулевая линия перестанет смещаться, трубку с образцом погружают в жидкий азот и выдерживают там до установления равновесия. После возвращения нулевой линии в исходное положение трубку с адсорбентом извлекают из азота и записывают кривую десорбции. Определенный объем газообразного азота вводят шприцем в систему ввода *6* таким образом, чтобы он дал одинаковый с десорбционной ветвью сигнал. С помощью такой калибровки рассчитывают объем десорбированного азота.

10.7.4. ХРОМАТОГРАФИЯ ПРОДУКТОВ ПИРОЛИЗА

Объединение пиролитического процесса с газовой хроматографией в единый аналитический процесс значительно расширяет возможности метода. С помощью газовой хроматографии

невозможно анализировать малолетучие соединения, поскольку при этом в колонке необходимо поддерживать очень высокую температуру, превышающую тот предел, при котором еще можно использовать неподвижную фазу, кроме того, некоторые компоненты образца при повышенных температурах могут разлагаться. Поэтому объединение пиролиза с газовой хроматографией в ряде случаев представляется весьма целесообразным.

Непосредственное присоединение пиролитической приставки к газовому хроматографу имеет ряд преимуществ: 1) высокая эффективность разделения и как результат быстрый, точный и очень детальный анализ продуктов пиролиза; 2) высокая чувствительность пламенно-ионизационного детектора, что позволяет использовать микрограммовые количества вещества для пиролиза; 3) идентификация продуктов пиролиза по характеристикам удерживания или масс-спектрам, если используется газовый хроматограф и масс-спектрометр; 4) возможность отбора отдельных продуктов пиролиза, позволяющая проводить их дальнейшее изучение и анализ. Газовый хроматограф с пиролитической приставкой может применяться как для качественного, так и для количественного анализа, а иногда и для определения физических постоянных пиролитического процесса [15].

Вещества, подвергаемые пиролизу дают смесь газообразных и жидких продуктов; их хроматограмма называется пирограммой. Пирограмма данного соединения, полученная в определенных экспериментальных условиях, является характерной и воспроизводимой. Пирограмма может содержать либо один, либо несколько типичных пиков. При пиролитическом разложении ряда полимеров, например полиметилакрилатов, образуется один и тот же типичный продукт. Однако обычно в процессе пиролиза образуется несколько продуктов, и в таких случаях иногда можно выбрать на хроматограмме типичный продукт, который характеризует анализируемое соединение, например уксусную кислоту для поливинилацетата, нитрилы для некоторых барбитуратов. Чтобы идентифицировать исследуемое соединение в отсутствие таких характерных продуктов, необходимо сравнивать полученные пирограммы с пирограммами модельных соединений. Отдельные компоненты пирограмм можно идентифицировать по методу, описанному в разд. 10.4.

Количественная оценка пирограмм основана на наличии определенного соотношения между количеством пиролизованного соединения и количеством полученных в результате пиролиза типичных продуктов. Если такие продукты отсутствуют, то на пирограмме выбирают наиболее характерные пики и строят для них калибровочную кривую. Чтобы результаты анализа были воспроизводимыми, необходимо поддерживать постоянными

экспериментальные условия, особенно температуру пиролиза. Даже незначительное изменение температуры может существенно повлиять на состав продуктов.

ТЕХНИКА ПИРОЛИЗА

Очень часто для пиролиза используется нить накала, см., например, конструкцию [49], показанную на рис. 10.41. Нить подключают таким образом, чтобы она могла нагреваться про-

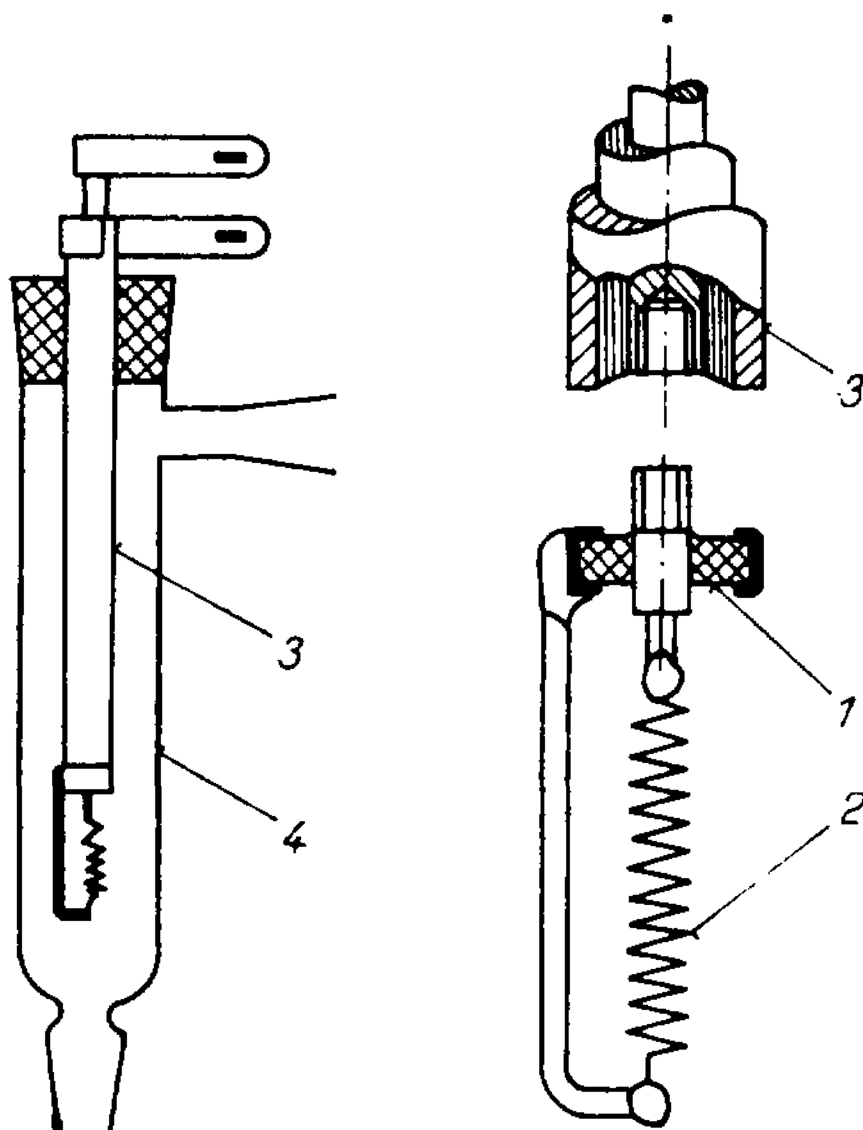


Рис. 10.41. Схема пиролитической ячейки.

1 — изолятор; 2 — нить; 3 — проточные каналы; 4 — пиролитическая ячейка.

текающим по ней током до определенной температуры за требуемое время (0,1—10 с). Образец, предварительно растворенный в летучем растворителе, наносят на нить и испаряют растворитель либо пропуская через нить слабый ток, либо облучая ИК-лампой. Поскольку температура нити неодинакова по ее длине (концы нити обычно холоднее), желательно наносить образец всегда на один и тот же участок нити. По этой причине в центре готовых нитей обычно имеется небольшая петля. На такие нити можно помещать твердые образцы. Вне зависимости от способа нанесения образца какая-то часть его может теряться. Из-за быстрого нагрева нити часть образца, непосредственно контактирующая с нитью, сразу же пиролизуется, и газы могут унести другую часть образца из зоны нагревания. Нить обычно

можно использовать от 10 до 40 раз. В процессе пиролиза выделяется углерод, который растворяется в горячей нити, что приводит к уменьшению ее механической прочности и локальному изменению электрических свойств. Обычно при этом приходится увеличивать ток, необходимый для нагревания нити до заданной температуры, до тех пор, пока он не достигнет такой величины, при которой нить начинает гореть. Используя небольшую лодочку, нагреваемую спиралью, можно избежать этих трудностей, но образец при этом нагревается медленнее (несмотря на это, воспроизводимость результатов остается очень хорошей).

Гидролиз можно также проводить не на нити, а в реакторной ячейке. Этот способ имеет определенные преимущества. Образец нагревается до требуемой температуры быстрее, поскольку ячейку предварительно нагревают. Температура выдерживается более четко благодаря термостату. Таким образом можно вести пиролиз точно взвешенных твердых образцов. Недостатки метода — возможность каталитического влияния стенок реактора и возможность вторичных реакций из-за длительного пребывания продуктов пиролиза в зоне нагрева. Чаще всего в качестве реактора используют трубки, введенные в печь, либо обычную, либо индукционную. Во втором случае необходимая температура достигается быстрее из-за использования точки Кюри. Иногда образец помещают в зону электрического разряда между электродами или нагревают ИК-излучением, или, если образец разлагается достаточно легко, допускается чтобы устройство для ввода образца в хроматограф было обогреваемым.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ПИРОЛИЗ

Основное влияние на пирограмму оказывает температура пиролиза. Температура пиролиза устанавливается лишь по истечении определенного времени, и нагреваемое вещество выдерживается некоторое время при температуре более низкой, чем температура пиролиза. Следовательно, пирограмма характеризуется не заданной температурой пиролиза, а некоторым температурным интервалом. Отклонения от пирограмм, соответствующих температуре пиролиза, становятся более заметными с увеличением времени, необходимого для достижения заданной температуры. Это время лежит в пределах от 0,08 с (для нити) до 400 с (для лодочки). При использовании реакторной ячейки это время значительно сокращается, поскольку образец вводят непосредственно в нагретый реактор.

Пиролиз должен проводиться как можно быстрее по двум причинам: во-первых, при повышенных температурах возможны

вторичные реакции и, во-вторых, продукты пиролиза должны вводиться в хроматографическую колонку в виде наиболее компактной зоны. Скорость выхода продуктов из зоны пиролиза также связана с длительностью пиролиза и зависит от конструкции реактора и скорости потока газа-носителя. Известно, что с увеличением скорости газа-носителя уменьшается вероятность прохождения вторичных реакций, но при этом предполагается, что скорость прохода газа через реактор не должна влиять на температуру последнего.

Вид пирограммы зависит также от давления газа-носителя и его природы. Пиролиз чаще всего проводится в инертной атмосфере. В присутствии кислорода результаты анализа всегда искажаются. В некоторых случаях проводится гидрогенизация продуктов пиролиза водородом. Высокое давление газа-носителя приводит к обогащению продуктов пиролиза низкокипящими соединениями. Материал, из которого изготовлен реактор (обычно стекло или кварц), и материал нити (обычно платина, нихром или вольфрам) чаще всего не оказывают заметного влияния на пирограмму. Хотя в ряде случаев и наблюдались некоторые отрицательные каталитические эффекты [15] (они проявляются в основном при использовании твердых носителей в ячейке реактора). Поверхность такой ячейки может быть в значительной степени покрыта продуктами пиролиза, полученными в предшествующих опытах, и каталитическая активность такой ячейки соответственно меняется.

ОСНОВНЫЕ ОБЛАСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Пиролитические методы наиболее часто используются для анализа полимеров [3, 15]. Описаны методики идентификации полиметилакрилатов, полиакрилатов, полистирола, полиакрилонитрила, полиэтилена, полипропилена, полидиенов, политетрафторэтилена, полиэфиров, полиамидов и различных сополимеров. Исследованы также пиролиз углеводородов, диалкилфосфатов, карбонилов различных металлов, силанов, солей четвертичного аммония, барбитуратов, фенотиазинов, порфиринов и т. д. Из числа природных материалов особенно подробно изучены аминокислоты и белки, стероиды, древесный уголь, нефть и минералы.

10.7.5. АНАЛИЗ СЛЕДОВ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Анализ следов методом газовой хроматографии целесообразен, если а) одновременно необходимо определить несколько компонентов смеси, б) примесные компоненты химически иден-

тичны основным, в) возможен автоматический и полуавтоматический анализ. Максимальная чувствительность хроматографического определения, необходимая для анализа следов, может быть достигнута оптимизацией четырех основных параметров метода: 1) чувствительности и селективности детектора, 2) максимального объема (массы) анализируемого соединения, 3) эффективности хроматографического разделения, 4) положения следов компонента на хроматограмме.

Оптимизация первых двух параметров привела к созданию двух групп методов — методов непосредственного анализа и обогатительных методов. В методах первой группы используются высокочувствительные, главным образом селективные детекторы, которые позволяют обнаруживать следы компонента в объеме образца, непосредственно введенного в хроматограф. Методы второй группы позволяют работать с большими объемами образца (от нескольких десятков до сотен литров газов или от нескольких до сотен миллилитров жидкости). При непосредственном введении в хроматограф такого объема газа или жидкости эффективность колонки значительно снизилась бы или вообще упала до нуля.

НЕПОСРЕДСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ

Чувствительность метода определяется главным образом чувствительностью детектора. Минимальное детектируемое количество определяется уравнениями:

$$n_i\,(\mathrm{min}) = (k_m/b)\,[A_i\,(\mathrm{min})/(a_{i0} - a_0)] \tag{10.61}$$

для проточно-массовых детекторов и

$$n_i\,(\mathrm{min}) = k_c\,(F/b)\,[A_i\,(\mathrm{min})/(a_{i0} - a_0)], \tag{10.62}$$

для концентрационно-зависимых детекторов, где $n_i(\mathrm{min})$ — минимальное детектируемое количество компонента i; F — скорость потока газа-носителя; b — скорость перемещения ленты; a_{i0} — удельный отклик детектора для вещества i и a_0 — отклик на газ-носитель; $A_i(\mathrm{min})$ — минимальная определяемая площадь на хроматограмме для вещества i; R_m и k_0 — константы.

Максимальный объем образца $V_{\text{образца}}$, который не приводит к значительному изменению хроматографической кривой и, следовательно, к потере эффективности колонки, определяется соотношением

$$V_{\text{образца}} < a_r \sqrt{n}\,(V_M + K_D V_L) \tag{10.63}$$

или

$$V_{\text{образца}} < a_r\,(V_g/\sqrt{n}), \tag{10.64}$$

где n — число теоретических тарелок; V_g — удельный объем удерживания; V_M и V_L — объемы подвижной и неподвижной

фаз в колонке и K_D — константа распределения. Фактор a_r характеризует размытость хроматографического пика по сравнению с пиком, полученным для образца очень малого объема. Уравнение (10.63) характеризует гипотетический объем одной теоретической тарелки в колонке. Положение вещества на хроматограмме (объем удерживания V_R) влияет на минимальное детектируемое количество c_{min} (для хроматографического метода, но не для детектора), которое определяется как

$$c_{min} = 2V_R n_i (\min)/\sqrt{n}. \qquad (10.65)$$

Чувствительность метода можно повысить, уменьшая объем удерживания компонента, содержащегося в следовых количествах, или увеличивая эффективность колонки при поддержании постоянной чувствительности детектора. Часто, чтобы понизить объем удерживания, можно с успехом использовать систему с селективным детектором, если она позволяет селективно регистрировать один продукт пиролиза без отделения его от остальных. Соответственно в ряде случаев можно воспользоваться фронтальной методикой газовой хроматографии.

ОБОГАТИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

Обогатительные методы предусматривают накопление следов компонента (увеличение его концентрации). Хроматография — один из немногих методов, позволяющих объединить процесс накопления с последующим анализом и количественным детектированием.

Коэффициент обогащения определяется следующим выражением:

$$m_S/m_Z = S_{S/Z} (m_S)_{or}/(m_Z)_{or} \qquad (10.66)$$

где m — количество (масса, объем, число молей) основного компонента (индекс Z) или следов (индекс S) после обогащения или в исходной смеси (индекс or).

Хроматографические обогатительные методы делятся на три группы: *а*. Обогащение следов вещества в колонке, в которой основной компонент адсорбируется слабее. *б*. Обогащение путем удаления основного компонента на колонке, где он сильнее адсорбируется или вступает в химическую реакцию и т. д. *в*. Обогащение и разделение на одной и той же колонке (метод известен под названием «возвратной хроматографии»).

В методах *а* и *б* применяется система из двух колонок — обогатительной и хроматографической, — в которой последнюю колонку можно отключить с помощью крана или стандартного устройства для ввода пробы (рис. 10.42) [83]. При заданной температуре поток определенного объема образца проходит че-

рез обогатительную колонку, которая может работать по любому хроматографическому принципу. Объем образца либо измеряют расходомером, либо рассчитывают, исходя из фазового равновесия в обогатительной колонке [69], устанавливаемого при рабочей температуре. По окончании процесса обогащения температуру обогатительной колонки повышают так, чтобы определяемый компонент десорбировался возможно скорее. Одновременно (или перед нагреванием) обогатительную колонку соединяют с хроматографической колонкой. Десорбирующиеся компоненты поступают в хроматографическую колонку, разделяются в ней, их количество устанавливается по отклику предварительно откалиброванного детектора.

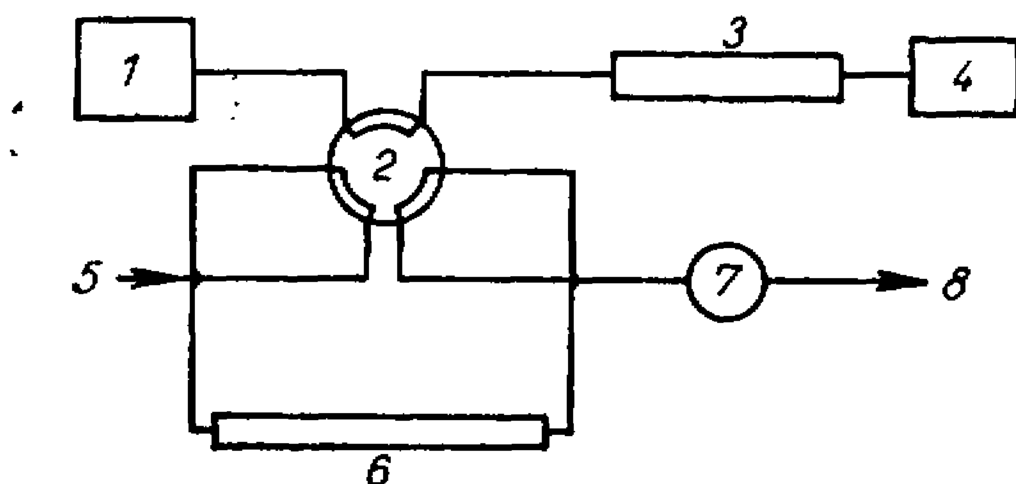


Рис. 10.42. Схема подсоединения обогатительной колонки.

1 — регулятор потока газа-носителя; 2 — шестиходовой кран; 3 — хроматографическая колонка; 4 — детектор; 5 — ввод анализируемого газа; 6 — обогатительная колонка; 7 — интегральный расходомер; 8 — выход анализируемого газа.

При использовании этих методов должны соблюдаться следующие правила. Температура, при которой проводится обогащение, должна быть достаточно низкой, иначе возможны потери вследствие элюирования определяемых компонентов (если объем анализируемого образца измеряется после выхода образца из обогатительной колонки). Температура десорбции должна быть достаточно высокой, чтобы десорбция компонентов прошла количественно за достаточно малое время (для достижения эффективности разделительной колонки). Коэффициент обогащения должен быть достаточно высоким, чтобы концентрация анализируемого компонента была достаточной для детектирования и чтобы основной компонент не мешал детектированию.

Метод, объединяющий обогащение с разделением, называют возвратной хроматографией. Этот метод (рис. 10.43) предусматривает применение подвижного температурного градиента в хроматографической колонке. Предполагается, что каждый компонент проходит до той части колонки, где температура соответствует его адсорбционному равновесию (так называемая характеристическая температура), после этого его скорость перемещения по колонке становится равной скорости перемещения

температурного градиента. Такая температура называется характеристической температурой T_S, для компонента S она определяется выражением

$$T_S = Q_S/(R \ln AW/u), \qquad (10.67)$$

где Q — теплота адсорбции; R — газовая постоянная; W — скорость перемещения температурного градиента (т. е. скорость перемещения печи); u — скорость газа-носителя; A — постоянная.

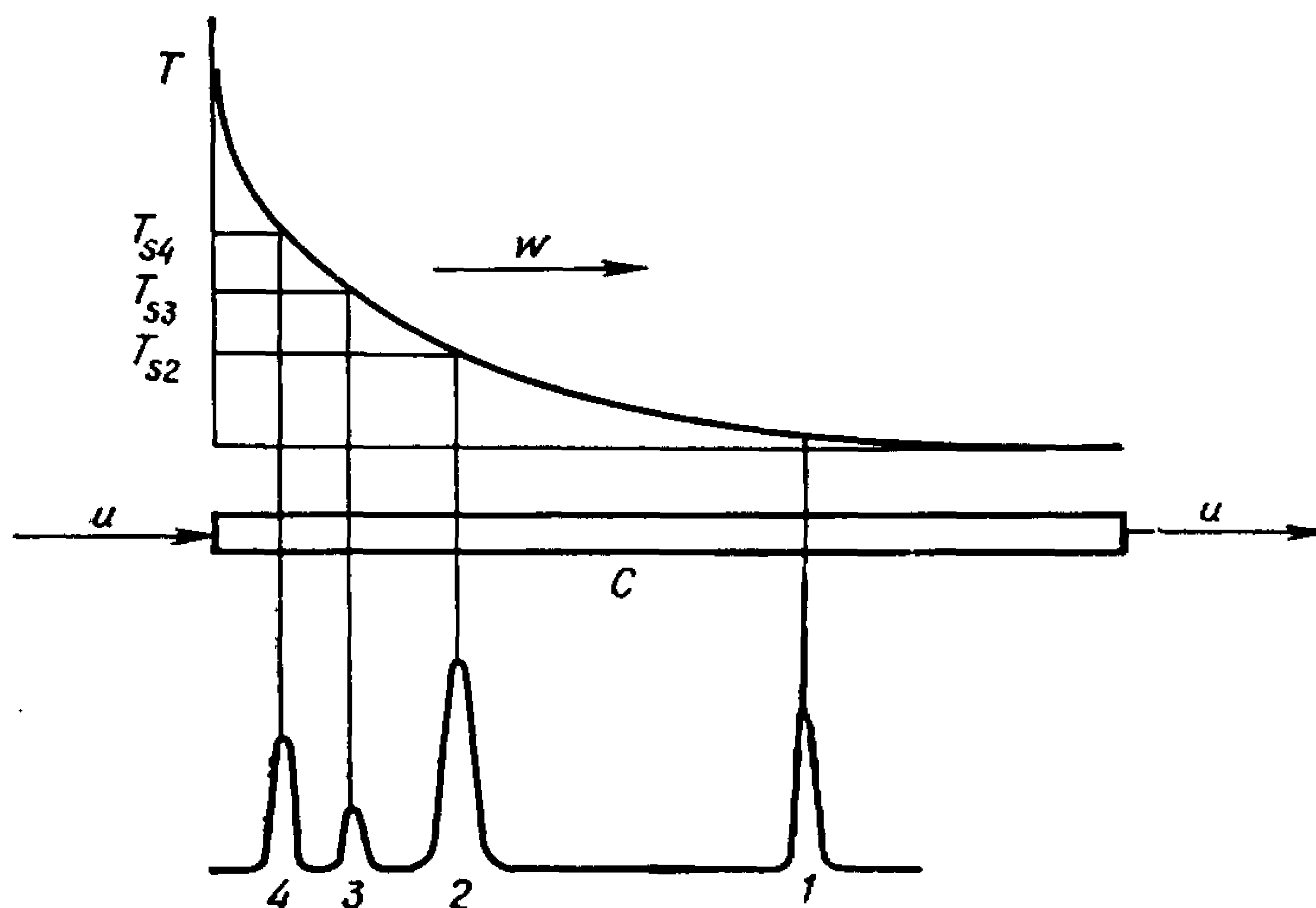


Рис. 10.43. Схема разделения методом возвратной хроматографии.

C — колонка; u — скорость газа-носителя; w — скорость перемещения температурного градиента вдоль колонки; T — температура; T_S — характеристическая температура; 1—4 — компоненты анализируемой смеси.

Однако часто непосредственно объединить газовую хроматографию с процессом обогащения не представляется возможным. В таких случаях следы обычно экстрагируют и их концентрацию в экстракте измеряют независимо. В любом случае особое внимание должно быть обращено на количественную подготовку исходного образца. При обогатительном методе абсолютная чувствительность достигает до 10^{-6} частей на миллион.

10.8. ПРИМЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

10.8.1. АНАЛИЗ ГАЗОВ И НЕКОТОРЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ИГРАЮЩИХ ВАЖНУЮ РОЛЬ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ

Хроматографический анализ газов характеризуется некоторыми особенностями методики анализа и способов ввода образца. Сосуды для газообразных образцов часто используются для

их переноски и хранения. Резиновые или пластмассовые сосуды для этого обычно не пригодны. Одни газы растворяются в них (например, углеводороды растворяются в резине и поливинилхлориде), а другие (CO_2, H_2, He и т. д.) могут диффундировать через стенки. Солевые растворы, применяемые в качестве жидких затворов, могут также обеднять образец некоторыми компонентами. Лучше всего хранить газообразные образцы в стеклянных сосудах, а в качестве затвора использовать ртуть. Объем

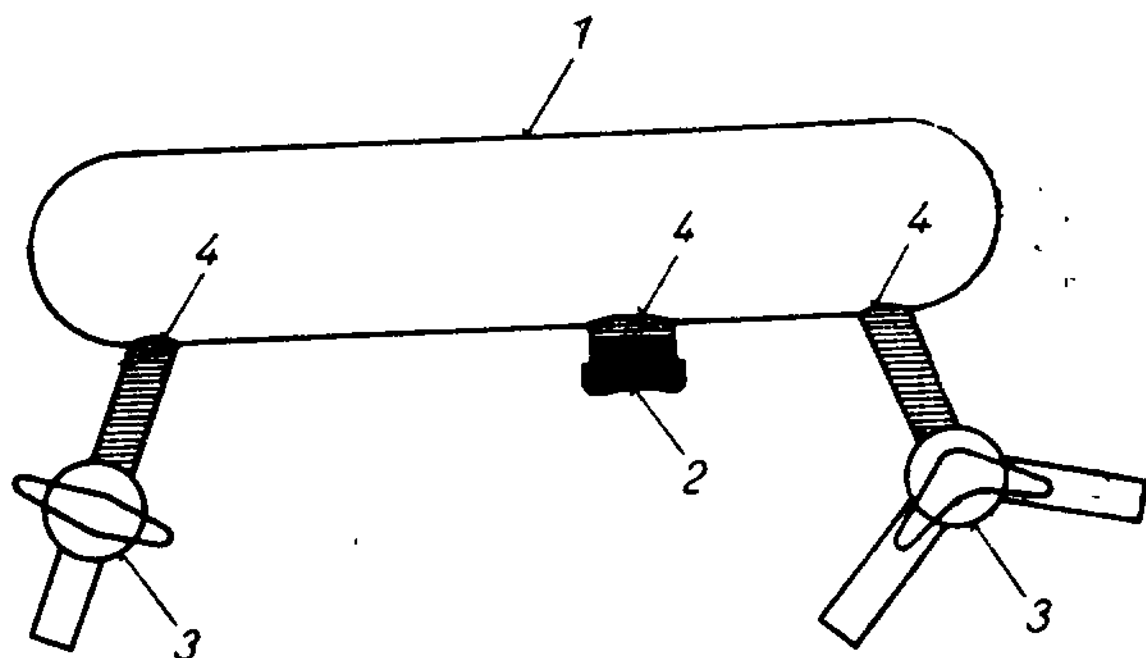


Рис. 10.44. Сосуд для газообразных образцов.
1 — сосуд; *2* — резиновая крышка; *3* — краны; *4* — запорная жидкость (ртуть).

сосудов обычно меньше, чем в классическом газовом анализе; вполне достаточно объема 10—50 мл. Очень удобно закрывать горло сосуда прокладкой из специальной резины, чтобы образцы можно было отбирать шприцем. Типичный сосуд показан на рис. 10.44.

Газообразную пробу вводят в хроматограф либо через петлю для образца (см. 10.6), либо шприцем. Объем пробы обычно равен от 0,1 до 5 мкл; бо́льшие объемы используются только в исключительных случаях. Чем больше внутренний диаметр шприца, тем труднее сохранить давление на входе в колонку и тем больше вероятность того, что часть образца потеряется. Чаще всего газы утекают через зазоры между поршнем и стенками шприца (если поршень не притертый или если шприц не снабжен приспособлением для ввода пробы) и в месте прокола резиновой прокладки иглой.

Газы — особенно постоянные — чаще всего анализируют методом газо-адсорбционной хроматографии. Эффективность адсорбционных колонок обычно ниже, чем у жидкостных колонок, особенно для веществ с большим объемом удерживания. Селективность адсорбента может меняться с изменением содержания

воды в адсорбенте (рис. 10.45), которая появляется либо из-за плохой активации адсорбента, либо из-за плохой очистки газа-носителя. Преимущество адсорбционных колонок по сравнению с колонками с неподвижной жидкой фазой — легкость их регенерации при нагревании. Большинство постоянных газов, за исключением углеводородов, не обнаруживаются пламенно-ионизационным детектором, поэтому обычно в качестве детектора используется катарометр. Для повышения чувствительности обнаружения иногда полезно воспользоваться детектором по электронному захвату или применять каталитическое превращение газов в метан, который детектируется пламенно-ионизационным детектором.

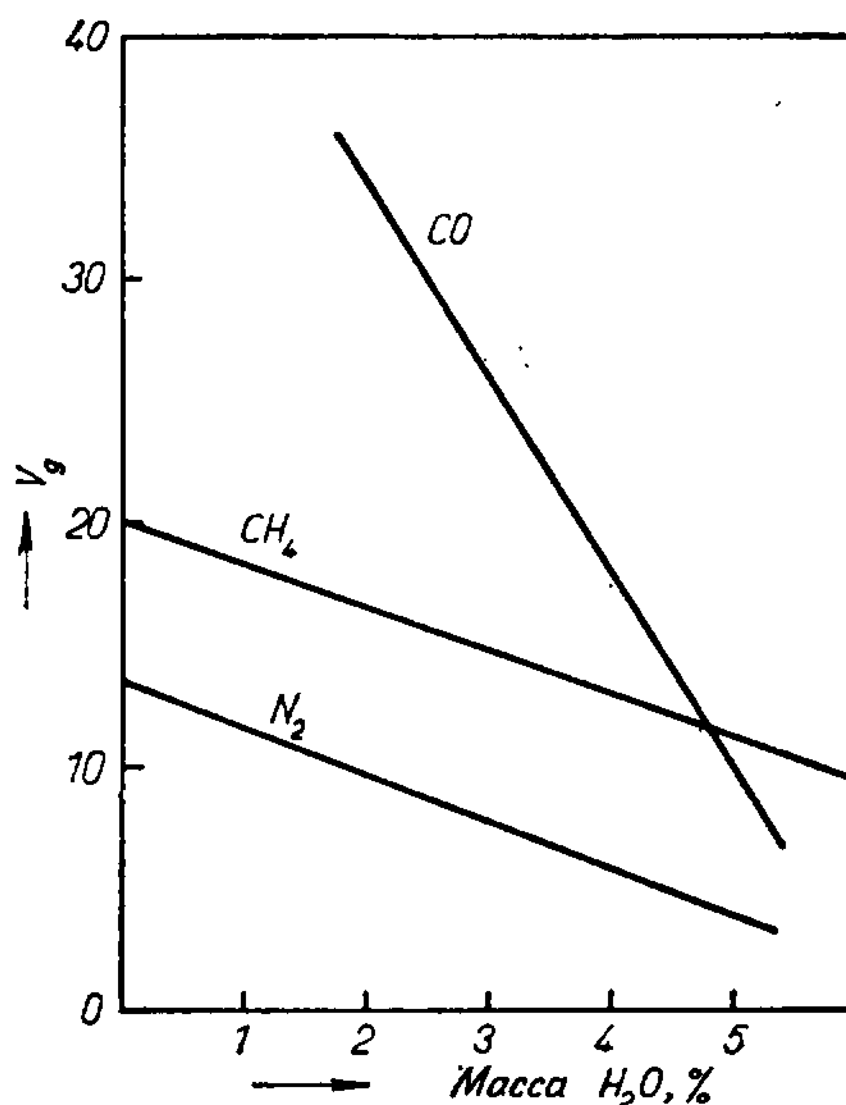


Рис. 10.45. Влияние содержания воды в адсорбенте (молекулярное сито 5А) на характеристики удерживания (удельный объем удерживания V_g).

Большинство газообразных образцов образуется в процессе горения. Обычно это смеси, содержащие некоторые (или все) из перечисленных газов: водород, кислород, оксид или диоксид углерода, оксиды азота и серы, метан и другие летучие углеводороды, азот. Для разделения водорода, кислорода, азота, метана и оксида углерода наиболее пригодно молекулярное сито 5А (алюмосиликат кальция). На колонке, заполненной 20 г адсорбента с частицами размером 0,1—0,2 мм, используя аргон или гелий в качестве газа-носителя (со скоростью потока 1 мл/с), эту смесь разделяют при комнатной температуре. Адсорбент необходимо активировать в течение 6 ч при температуре около 450 °С. Вода, содержащаяся в адсорбенте (степень полноты активации), влияет на относительное удержива-

ние компонентов (см. рис. 10.45). Однако емкость молекулярного сита 5А по отношению к воде очень высока (он адсорбирует до 12% воды), так что влажность газов не имеет практического значения. Анализ можно повторять много раз до заметного изменения адсорбционных свойств. Молекулярное сито 5А сильно адсорбирует диоксид углерода (он количественно определяется только при температуре, близкой к температуре активации) и поэтому непригодно для анализа последнего.

Выделяют диоксид углерода на колонке, заполненной порапаком Q. Первая фракция, выходящая из колонки, представляет собой смесь водорода, кислорода, азота и оксида углерода, вторая фракция — чистый метан, третья — диоксид углерода. Разделение ведется на колонке размером 1 м×2 мм (внутр. диаметр) при комнатной температуре. Если необходимо разделить смесь на отдельные компоненты, то можно использовать порапак Q при пониженной температуре. Однако эта методика не всегда применима, поскольку серийные хроматографы не пригодны для работы при пониженных температурах. Значительно чаще разделение ведут на двух параллельных колонках, одна из которых заполнена молекулярным ситом 5А, другая — порапаком Q. Скорость потока газа-носителя регулируется таким образом, чтобы в колонке с порапаком Q она была больше. Образец делится перед колонками в соотношении, соответствующем скоростям потока, и соединяется вновь перед детектором, который регистрирует фракции в порядке их прохождения: 1) кислород, азот, оксид углерода (выходящие вместе); 2) диоксид углерода; 3) кислород, 4) азот; 5) оксид углерода. В некоторых случаях можно использовать два детектора (по одному на каждую колонку), но при этом необходима точная регулировка скорости потока.

Газообразные соединения серы можно разделить на активированном силикагеле деактигель (Davison Grade 12) при температуре 120 °С. Компоненты смеси с частицами размером 0,1—0,2 мм в алюминиевых колонках 60 см×4 мм (внутр. диаметр) элюируются в следующем порядке: воздух, CO_2, COS, H_2S, CS_2, SO_2. Анализ оксидов азота обычно ведется на двух колонках. На одной колонке (2,7 м×3 мм), заполненной молекулярным ситом 5А, пропуская при 35 °С азот (50 мл/мин), разделяют O_2 и NO; NO_2 адсорбируется на колонке необратимо. На второй колонке (6 м×1 мм), заполненной носителем флюоропак 80, на который нанесено 10% неподвижной фазы, 10% SF=96, пропуская при 25 °С азот (4 мл/мин), отделяют NO (который появляется вместе с кислородом) от NO_2. Преимущественно используется электронно-захватный детектор. При проведении таких анализов следует помнить о возможности реакции оксида азота с кислородом. Если в образце содержится кислород, то

он при прохождении через колонку реагирует с N_2O так, что найденное количество N_2O обычно меньше действительного, а найденное количество NO_2 соответственно больше.

Результаты анализа газов часто могут быть ошибочными из-за отсутствия достаточно чувствительных детекторов. Те соединения (CO, CO_2 и т. д.), которые не обнаруживаются ни электронно-захватным, ни пламенно-ионизационным детектором, особенно трудно детектируются в малых концентрациях. Имен-

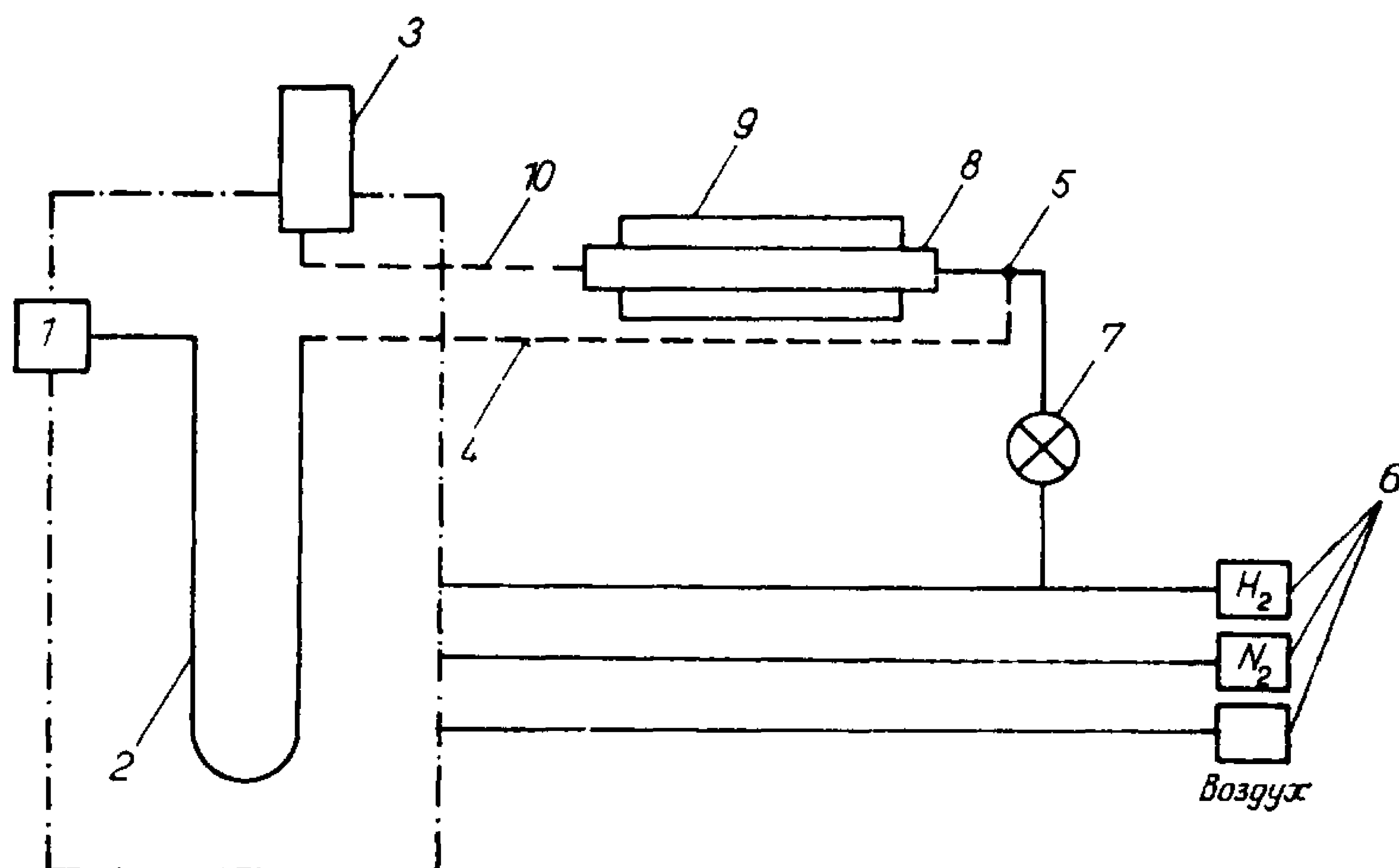


Рис. 10.46. Схема каталитического конвертера с подсоединенным к нему газовым хроматографом.

1 — ввод пробы; 2 — колонка; 3 — пламенно-ионизационный детектор; 4 — капилляры (вн. диам. 0,1—0,5 мм); 5 — Т-образная трубка; 6 — источники газа; 7 — игольчатый клапан; 8 — катализатор; 9 — печь; 10 — капилляры.

но по этой причине был разработан метод превращения этих газов в метан, который детектируется пламенно-ионизационным детектором с достаточной чувствительностью. Преимущества данного метода — простота, с которой серийные детекторы приспосабливаются для проведения таких анализов (если, конечно, реактор поставляется вместе с детекторами).

На рис. 10.46 показана схема подключения каталитического конвертера. Катализатор приготавливают следующим образом. В фарфоровой чашке смешивают 3 г $Ni(NO_3)_2$, 6 г H_2O и 0,45 г $Th(NO_3)_4 \cdot 4H_2O$. К смеси добавляют навеску носителя (30 г) с частицами размером 0,2—0,4 мм (хромосорб W, хроматон, поровина) и добавляют такое количество дистиллированной горячей воды, чтобы образовалась паста. Приготовленную пасту нагревают на небольшом пламени до полного испарения воды, затем

пламя увеличивают и продолжают нагревать смесь до полного удаления оксидов азота. Катализатор помещают в кварцевую трубку и гидрогенизуют, нагревая примерно 8 ч в электрической печи при 350—400 °С в токе водорода. Приготовленный катализатор помещают в кварцевую трубку диаметром 3—4 мм и длиной примерно 25 см, которая соединяется с хроматографом описанным выше способом. В хроматографе катализатор нагревают печью с тем, чтобы его температура составляла около 400 °С.

После подключения катализатора к газовой линии поток водорода регулируют таким образом, чтобы проходящий через катализатор газ содержал по крайней мере 60% водорода по отношению к газу-носителю, обычно азоту. Однако оптимальный режим работы пламенно-ионизационного детектора требует присутствия водорода только в очень малых концентрациях. Такой способ гидрогенизации обычно применяется только для определения оксида и диоксида углерода. Наименьшее детектируемое количество в 5 мл образца, например воздуха, составляет примерно $0,5 \cdot 10^{-4}$ CO. Этот метод можно также использовать и для анализа других газов, например CS_2, COS, HCN, $(CN)_2$.

Хроматография часто используется [22] для определения состава неизвестных сложных смесей при исследовании химического влияния на окружающую среду. Пока еще не разработаны анализаторы постоянного действия, позволяющие выявить какие-то определенные загрязняющие примеси, например, в воздухе или воде. При проведении анализа сложных смесей обычно проводится их обогащение или применяется экстракция, позволяющие определять компоненты при концентрациях их ниже 10^{-12}% с высокой селективностью. Для выявления газовых включений часто используется методика обогатительной хроматографии. Например, при определении кислородсодержащих компонентов в выхлопных газах обогащение проводят в колонках из нержавеющей стали (3,5 м×4 мм, внутр. диаметр), заполненных хромосорбом W (размер частиц 0,2—0,4 мм), на который нанесено 20% 1,2,3-трис(2-цианэтокси)пропана. Обогащение ведется при 20 °С при пропускании через колонку гелия со скоростью 100 мл/мин. Углеводороды проходят через колонку, практически не задерживаясь, так что в десорбционном цикле в аналитическую колонку поступают только кислородсодержащие соединения. Аналитическую колонку — трубку из нержавеющей стали длиной 3,5 м с внутренним диаметром 2 мм и внешним диаметром 3,5 мм — упаковывают порапаком Q с частицами размером 0,1—0,2 мм. Разделение ведут при 156 °С, газом-носителем служит гелий, который пропускают со скоростью 50 мл/мин. Пики на хроматограмме следуют в таком порядке: ацетальдегид, окись пропилена, пропионовый альдегид,

ацетон, акролеин, *транс*-2,5-диметилтетрагидрофуран, бутилальдегид, *цис*-2,5-диметилтетрагидрофуран, метанол, кротональдегид. Анализ длится 100 мин.

Содержащиеся в воде примеси обычно сначала экстрагируют подходящим растворителем, например метиленхлоридом, хлороформом, сероуглеродом и т. д., и затем анализируют. С этой целью можно использовать капиллярную хроматографию. Например, фенолы разделяют в капиллярной колонке из нержавеющей стали длиной 20 м и диаметром 0,2 мм. Неподвижной фазой служит трикрезилфосфат (95 мг) с ортофосфорной кислотой (5 мг) в ацетоне (1,0 мл). Перед проведением анализа колонку выдерживают 3 ч при 120 °С. При этой температуре получают симметричные и полностью разрешенные пики следующих соединений (перечислены в порядке элюирования): фенол, 2-метилфенол, 2,6-диметилфенол, 4-метилфенол, 2,4-диметилфенол, 2,5-диметилфенол, 2,3-диметилфенол, 3,5-диметилфенол, 3,4-диметилфенол. На колонке 50 м×0,25 мм с неподвижной фазой DC 200 при программированном подъеме температуры от —8 до 130 °С получены 160 пиков углеводородов, из которых 116 идентифицированы масс-спектрометрически. Объем введенного образца газа составлял 1 мл.

10.8.2. АНАЛИЗЫ ОРГАНИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИ ВАЖНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Газохроматографический анализ используется для разделения ряда органических соединений и биологических жидкостей. Обычно это жидкие или твердые соединения. Метод их анализа описан в предыдущих разделах, а примеры разделения приведены в табл. 10.7 и 10.8.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ackman R. G.*, J. Cromatog. Sci., 10, 535 (1972).
2. *Arita K., Kuge I., Yoshikawa Y.*, Bull. Chem. Soc. Japan, 38, 632 (1965).
3. *Березкин В. Г.*, Аналитическая реакционная газовая хроматография. — М.: Наука, 1966.
4. *Black D. R., Flath R. A., Tramishi R.*, J. Chromatog. Sci., 7, 284 (1969).
5. *Bowman M. C., Beroza M.*, Anal. Chem., 40, 1448 (1968).
6. *Brody S. S., Chaney J. E.*, J. Gas Chromatog., 4, 42 (1966).
7. *Brunauer S., Emmett P. H., Teller E.*, J. Am. Chem. Soc., 60, 309 (1938).
8. *Camera E., Pravisani D.*, Anal. Chem., 39, 1645 (1967).
9. *Chundela B., Krejči M., Rusec M.*, Deut. Z. Ger. Med., 62, 154 (1968).
10. *Claesson S.*, Arc. Kemi. Min. Geol., A23, No. 1, 133 (1946).
11. Compilation of GC Data, Institute of Analityсal Chemistry, Czechoslovac Academy of Sciences, Brno.
12. *Cook C. E., Stanley C. W., Barney J. E.*, Anal. Chem., 36, 2354 (1964).
13. *Dawson H. J.*, Anal. Chem., 35, 542 (1963).

Таблица 10.7

Примеры анализов органических соединений, проведенных в обычных условиях

Разделяемые соединения (перечислены в порядке их элюирования)	Условия разделения			
	колонка (К); неподвижная фаза (НФ); носитель (Н); детектор (Д)	температура колонки, °С	газ-носитель; скорость потока, мл/мин	время, мин
Алифатические углеводороды C_1—C_5 (природный газ): метан, этан, пропан, изобутан, *н*-бутан, *изо*- и *н*-пентан	К: стекло, 130×0,3 см; НФ: хромосорб 102, 60—80 меш; Д: ДИП	110	He; 58	7
Низшие углеводороды, насыщенные и ненасыщенные: метан, этан, этилен, пропан, пропилен, изобутан, *н*-бутан, циклопропан, ацетилен, *н*-бутилен, пропадиен, *транс*-бутилен, изопентан, *цис*-бутилен, *н*-пентан, бутадиен-1,3, пентен-1, (*транс*-бутилен и изопентан не разделяются)	К: стекло, 1500×0,6 см; НФ: 20% ацетилацетона; Н: хромосорб R, 60—80 меш; Д: катарометр	23	He; 50	90
Пропан, пропен, изобутан, *н*-бутан, бутен-1, 2-метилбутен-1, *транс*-бутен-2, изопентан, *цис*-бутен-2, *н*-пентан, бутадиен-1,3	К: 640×0,3 см; НФ: 10% EDO-1; Н: хромосорб P-AW, 100—120 меш; Д: ДИП	0	N_2; 20	12
Бутен-1, 2-метилпропен-1, *транс*-бутен-2, *цис*-бутен-2	К: нерж. сталь, 800×0,3 см; НФ: 20% полипропиленкарбоната; Н: хромосорб P-AW, 60—80 меш; Д: ДИП	0	N_2; 30	9
Насыщенные и ненасыщенные углеводороды C_{10}—C_{15}: декан, децен-1, ундекан, ундецен-1, додекан, додецен-1, тридекан, тридецен-1, тетрадекан, тетрадецен-1, пентадекан, пентадецен-1	К: стекло, 190×0,4 см; НФ: 20% 1,2,3-трис(цианоэтокси)пропана; Н: газохром Р, 80—100 меш; Д: ДИП	Программируется, 80—150; 5 °С/мин		
Низшие углеводороды + CO + CO_2: воздух, монооксид углерода, метан, диоксид углерода, ацетилен, этилен, этан	К: 130×0,3 см; НФ: карбосив В, 60—80 меш; Д: катарометр	35	He; 40	9

Метилциклогексены: 1-метилциклогексен, 4-метилциклогексен, 3-метилциклогексен, метилциклогексан	К: стекло, **200×0,4 см; НФ: 20% $AgNO_3$/** раствор в этиленгликоле; Н: целит С-22, 50—80 меш; Д: катарометр	30	He; 66	70
Монотерпеновые углеводороды: α-пинен, камфен, β-пинен, Δ^3-карен, мирцен, α-фелландрен, лимонен, γ-терпинен, *п*-кумен	К: нерж. сталь, 400×0,22 см; НФ: 10% карбовакса 400; Н: хромосорб W, 80—100 меш; Д: ДИП	90	N_2; 10	17
Сесквитерпеновые углеводороды: бициклоелемен, кубебен, иланген, β-елемен, α-бурбонен, β-бурбонен, ε-мунролен, гумулен, γ-мунролен, α-мунролен, ε-булгарен, ε-кадинен	К: нерж. сталь, капилляр., 50 м×2 мм; НФ: апиезон L; Д: ДИП	160	He; 1,2	15
Ароматические углеводороды: бензол, толуол, этилбензол, *п*-, *м*- и *о*-ксилол	К: 190×0,3 см; НФ: 5% изодецилфталата+5% бентона 34; Н: хромосорб W-AW, 80—100 меш; Д: ДИП	75	N_2; 20	
Бензол, толуол, этилбензол, стирол, α-метилстирол	К: 200×0,3 см; НФ: 10% SE-30; Н: хромосорб W-AW-DMCS, 70—80 меш; Д: ДИП	150	N_2; 20	
Ксилол, 1,3,5- и 1,2,4-триметилбензол, 1,2,3-триметилбензилиндан, нафталин, бифенил, 1,2-диметилнафталин, аценафтен, дифениленоксид, флуорен, фенантрен, пирен, 1,2-бензофлуорен, кризен	К: 190×0,4 см; НФ: 10% апиезона L; Н: хромосорб W, 60—80 меш; Д: катарометр	Программируется, 50—330; 4 °С/мин	He; 72	70
Хлорированные углеводороды: воздух, вода, метил-, винил- и этилхлорид	К: 190×0,45 см: НФ: порапак Q, 80—100 меш; Д: катарометр	133	He; 47	6
Галогенированные углеводороды: воздух, этилен, винил-, этил- и изопропилхлорид, этил-, аллил- и винилбромид	К: нерж. сталь, 400×0,4 см; НФ: 10% сквалана; Н: хромосорб R, 60—80 меш; Д: катарометр	23	He; 60	24
Спирты C_1—C_5: метанол, этанол, *изо*- и *н*-пропанол, *трет*-, *втор*, *изо*- и *н*-бутанол, *трет*- и *втор*-амиловый спирт, оптически активные изомеры амилового спирта, *изо*- и *н*-амиловый спирт	К: нерж. сталь, 190×0,3 см: НФ: 10% халькомида М-18-OL; Н: супелкопорт, 80—100 меш; Д: ДИП	100	N_2; 20	11
Оптически активный амиловый и изоамиловый спирты не разделяются.				
Частичное разделение изо- и *н*-бутанола	К: нерж. сталь, 190×0,3 см; НФ: порапак Q, 80—100 меш; Д: ДИП	200	N_2; 20	10

Разделяемые соединения (перечислены в порядке их элюирования)	Условия разделения			
	колонка (К); неподвижная фаза (НФ); носитель (Н); детектор (Д)	температура колонки, °С	газ-носитель; скорость потока, мл/мин	время, мин
Частичное разделение *н*-пропанола и *трет*-бутанола	К: нерж. сталь, 190×0,3 см; НФ: хромосорб 101, 80—100 меш; Д: ДИП	200	N_2; 20	4
Частичное разделение *н*-пропанола и *трет*-амилового спирта	К: нерж. сталь 190×0,3; НФ: 0,4% карбовакса 1500; Н: карбопак А, 60—80 меш; Д: ДИП	120	N_2; 20	14
Спирты C_2—C_{18}	К: 160×0,3 (двойная); НФ: 15% FFAP; Н: хромосорб W-DMCS, 70—80 меш; Д: ДИП	Программируется, 55—270; 14 °С/мин	He; 25	16
Диолы: этиленгликоль, пропандиол-1,2, бутандиол-2,3; пропандиол-1,3, бутандиол-1,3, бутандиол-1,4, диэтиленгликоль, глицерол	К: стекло, 130×0,3 см; НФ: хромосорб 101, 100—120 меш; Д: ДИП	210	He; 50	4
Жирные кислоты C_1—C_3 и вода: вода, муравьиная, уксусная и пропионовая кислоты	К: 130×0,2 см; НФ: хромосорб 101, 60—80 меш; Д: катарометр	250	N_2; 20	4
Жирные кислоты C_1—C_5 и вода: вода, уксусная, муравьиная, пропионовая, масляная и валериановая кислоты	К: нерж. сталь, 180×0,3 см; НФ: цианэтилметакрилат, 0,2—0,4 см; Д: катарометр	136	N_2; 30	20
Жирные кислоты C_{14}—C_{18}	К: стекло 100×0,4 см; НФ: 5% диэтиленгликольсебаката; Н: CW-HP; Д: ДИП	200	N_2; 70	8
Метиловые эфиры высших жирных кислот: метилпальмитат, метилстеарат, метилолеат, метиллинолат	К: стекло, 190×0,4 см; НФ: 5% диэтиленгликольсебаката; Н: CW-HP; Д: ДИП	180	N_2; 70	8
Метиловые эфиры бензолкарбоновых кислот: хлороформ, метилбензоат, диметилтерефталат, диметилизофталат, диметилфталат	К: стекло, 160×0,6 см; НФ: 2%-тетракис-О-(2-цианоэтил)-пентаэритрита; Н: поровина, 0,2—0,3 мм; Д: катарометр и ДИП	203	N_2 или H_2; 30	60

Алифатические и циклические кетоны: ацетон, метилэтилкетон, 3-метилбутанол-2, пентанон, 3,3-диметилбутанол-2, циклопентанон, гептанон, 4-метилциклогексанон, октанон-2, ацетофенол	К: нерж. сталь 100×0,3 см; НФ: порапак Q, 150—200 меш; Д: ДИП	Программируется, 170—245; 10 °С/мин	He; 60	12
Циклические спирты и кетоны: 2,2-диметилциклогексанон, 2-метилциклогексанон, циклогексанон, *цис*-2-метилциклогексанол, *транс*-2-метилциклогексанол, циклогексанол	К: стекло, 160×0,6 см; НФ: 20% глицерола; Н: целит 545, 0,2—0,3 мм; Д: катарометр	107	N_2; 30	65
Различные кислородсодержащие соединения: вода, метанол, этанол, ацетон, метилэтилкетон, тетрагидрофуран, диоксан, диметилформамид	К: 190×0,4 см; НФ; порапак *Q*, 150—200 меш	220	He; 37	
Этиленоксид, ацетальдегид	К: нерж. сталь, 300×0,4 см; НФ: 25% β,β′-оксидипропионитрила; Н: целит 545, 80—100 меш; Д: катарометр	23	He; 60	14
Фенолы, крезолы, ксиленолы: фенол, *о*-, *п*- и *м*-крезол, 2,4-, 2,5-, 2,3- и 3,5-ксиленол, *п*- и *м*-этилфенол (частичное разделение *п*- и *м*-крезола, 2,4- и 2,5-ксиленола; 3,5-ксиленол и *м*-этилфенол не разделяются)	К: стекло, 120×0,45 см; НФ: 5% 2,4-ксиленолфосфата; Н: целит, 100—120 меш; Д: аргоновый	110	Ar	60
Алифатические амины: метил-, диметил-этил-, триметил-, изопропил-, аллил- и *н*-пропиламин, *трет*-, *втор*-, *изо*- и *н*-бутиламин	К: стекло, 140×0,4 см; НФ: 4% карбовакса 20 М+8% КОН; Н: карбовак В; Д: ДИП	91,5	He; 50	14
Метил-, этил-, изопропил-, *н*-пропил-, *втор*-бутил-, *н*-бутил-, изопентил-, *н*-пентил- и *н*-гексиламин	К: 130×0,4 см; НФ: хромосорб 103, 100—120 меш; Д: ДИП	Программируется, 200—250 °С; 15 °С/мин	He; 35	4
Ароматические амины: анилин, N-метиланилин, N-этиланилин, N-бутиланилин	К: 130×0,4 см; НФ: хромосорб 103, 50—60 меш; Д: ДИП	240	He; 50	7

Продолжение табл. 10.7

Разделяемые соединения (перечислены в порядке их элюирования)	Условия разделения			
	колонка (К); неподвижная фаза (НФ); носитель (Н); детектор (Д)	температура колонки, °С	газ-носитель; скорость потока, мл/мин	время, мин
Гетероциклические азотсодержащие, циклические и ароматические амины: пиперидин, пиридин, морфолин, циклогексиламин, метилциклогексиламин, N-изопропилциклогексиламин, анилин, N-метилпирролидон, N,N-диметиланилин	К: стекло, 190×0,4 см; НФ: 28% пеннвальта 223+4% КОН; Н: газохром Р, 80—100 меш; Д: ДИП	160		15
Нитропарафины C_1—C_3: вода, нитрометан, нитроэтан, 2-нитропропан, 1-нитропропан.	К: 190×0,45; НФ: порапак Q, 80—100 меш; Д: катарометр	206	He; 80	7
Метилхлорсиланы: триметилхлорсилан, метилдихлорсилан, трихлорсилан, диметилдихлорсилан, метилтрихлорсилан, тетрахлорсилан	К: 450×0,3 см; НФ; 10% SE-30; Н: хромосорб W-AW-DMCS, 70—80 меш; Д: катарометр	25	N_2; 40	
Фенилхлорсилазаны: тетрахлорсилазан, бензол, хлорбензол, фенилтрихлорсилазан, бифенил, дифенилдихлорсилазан	К: нерж. сталь, 200×0,4 см; НФ: 4% Сил Е; 302; Н: поровина, 0,2—0,3 мм; Д: катарометр	200	N_2; 30	25
Хлорсодержащие пестициды: линдан, алдрин, гептахлордиэлдрин	К: стекло, 190×0,4 см; НФ: 5% OV-1, Н: CW-HP; Д: электронно-захватный	170	N_2; 70	14
а-ВНС, линдан, алдрин, гептахлор, *n,n'*-DDE, *o,n'*-DDT, диэлдрин, *n,n'*-DDD, *n,n'*-DDT	К: 190×0,4 см; НФ: 5% CV-210; Н: газохром Q, 100—200 меш; Д: Электронно-захватный	182	N_2; 70	20
Фосфорсодержащие пестициды: метилпаратион, паратион, метилтритион, этион	К: стекло, 190×0,4 см; НФ: 3% OV-1; Н: CW-HP; Д: пламенно-фотометрический	200	N_2; 80	9

Таблица 10.8

Примеры анализов биологически важных соединений и лекарственных средств, проведенных в обычных условиях

Разделяемые соединения (перечислены в порядке их элюирования)	Условия разделения			
	колонка (К); неподвижная фаза (НФ); носитель (Н); детектор (Д)	температура колонки, °С	газ-носитель; скорость потока, мл/мин	время, мин
Триметилсилильные производные сахаров: арабинозы, α-ксилозы, α-маннозы, α-галактозы, α-глюкозы	К: стекло, 190×0,3 см; НФ: 3% поли-А-101А; Н: газохром Q, 100—200 меш; Д: ДИП	140	N_2; 30	27
Аминокислоты в виде N-трифторацетил-*н*-бутиловых эфиров: аланин, валин, глицин, изолейцин, лейцин, пролин, треонин, серин, цистеин, метионин, оксипролин, фенилаланин, аспарагиновая кислота, глутамовая кислота, тирозин, лизин, триптофан	К: стекло, 150×0,4 см; НФ: 0,325% адипината этиленгликоля; Н: хромосорб G-AW, 80—100 меш; К: стекло, 100××0,4 см; НФ: 1% OV-17; Н: активный хромосорб G, 80—100 меш; Д: ДИП	Программируется 100—210 °С	N_2; 50	30
Стероиды: андростан, холестан, тестостерон, прогестерон, холестерин, стигмастерин	К: стекло, 130×0,2 см; НФ: 3% OV-17; Н: CWHP; Д: ДИП	275	N_2; 40	10
Триметилсилильные производные стероидов мочи: андростерона, дигидроэпиандростерона, этиохоланолона, эстрола, эстрадиола, эстриола, прегнандиола, прегнентриола (андростерон и эстрадиол не разделяются)	К: стекло, 190×0,3 см; НФ: 3% OV-225; Н: газохром Q, 100—120 меш; Д: ДИП	230		15
Метиловые эфиры желчных кислот: метиллитохолат, метилдезоксихолат, метилхенодезоксихолат, метилхолат	К: стекло, 100×0,3 см; НФ: 3% Р-2250; Н: супелкон AW-DMCS, 100—120 меш; Д: ДИП	275	N_2; 40	17
Снотворные: барбитал, амобарбитал, секобарбитал, гексобарбитал, мефобарбитал, фенобарбитал	К: стекло, 190×0,2 см; НФ: 10% апиезона L, 2% КОН; Н: CW-HP; Д: ДИП	215	N_2; 40	6
Лекарственные средства: этинамат, мескалин, дифенилдигидрамин, глутоксимидин, кофеин, новокаин, кокаин, скополамин, хлорпромазин, тазепам	К: стекло, 190–0,35 см; НФ: 3% OV-17; Н: газохром Q, 100—120 меш; Д: ДИП	200	N_2; 40	36

14. *Dimbat M., Porter P. E., Stross F. H.*, Anal. Chem., **28**, 290 (1956).
15. *Dressler M., Krejčí M.*, Chem. Listy, **61**, 1455, (1967).
16. *Dressler M., Vespalec R., Janak J.*, J. Chromatog., **59**, 423 (1971).
17. *Eberly P. E. Jr.*, J. Phys. Chem., **65**, 68 (1961).
18. *Ettre L. S.*, Anal. Chem., **36**, No. 8, 31A (1964).
19. *Ettre L. S.*, Open Tubular Columns in Gas Chromatography, p. 80, Plenum Press, New York (1965).
20. *Evans M. B., Smith J. F.*, J. Chromatog., 5, 300 (1961).
21. *Evans M. B., Smith J. F.*, J. Chromatog., **6**, 293 (1961).
22. *Fischbein L.*, Chromatography of Enviconmental Hazards, Vol. 1, Elsevier, Amsterdam (1972).
23. Ford J. *H., Beroza M.*, J. Assoc. Offic. Anal. Chemists, **50**, 601 (1967).
24. *Gaston L. K.*, In Residue Revies, (F. A. Gunther, Ed.), p. 21, Vol. **5**, Academic Press, New York and Springer Verlag Berlin (1964).
25. *Giddings J. C.*, Dynamics of Chromatography, Dekker, New York (1965).
26. *Giuffrida L., Ives N. F.*, J. Assoc. Offic. Arg. Chemists, **47**, 1112 (1964).
27. *Glueckauf E.*, Nature, **156**, 748 (1945); Nature, **160**, 301 (1947); J. Chem. Soc., 1302 (1947); J. Chem. Soc., 1308 (1949).
28. *Golay M. J. E.*, in: Gas Chromatography 1958, (D. H. Desty, Ed.), p. 36, Butterworths, London (1958).
29. *Goodwin E. S., Goulden R., Reynolids J. G.*, Analyst, **86**, 687 (1961).
29a. *Grant D. W.*, Gas-Liquid Chromatography, Van Nostrand, London (1971).
30. *Grayson M. A., Wolf C. J.*, Anal. Chem., **39**, 1438 (1967).
31. *Green L. E.*, Facts and Methods, **8**, No. 4, 4 (1967).
32. *Greene S. A., Pust H.*, J. Phys. Chem., **62**, 55 (1958).
33. *Gregg S. J., Stock R.*, in: «Gas Chromatography», 1958 (D. H. Desty, Ed.), p. 90, Butterworths, London (1958).
34. *Gröbler A.*, J. Chromatog. Sci., **10**, 128 (1972).
35. *Hainova O., Boček P., Novák J.*, J. Gas Chromatog., **5**, 401 (1967).
36. *Halász I., Schay G.*, Z. Anorg. Chem., **287**, 242 (1956).
37. *Hartman C. H.*, Bull. Environ. Contam. Toxicol, **1**, 454 (1966).
37a. *Hartman C. H.*, Anual Chem., **43**, No. 2, 113A (1971).
38. *Horning E. C., Horning M. C., Carrol D. I., Dzidic I., Stillwell R. N.*, Anal. Chem., **45**, 936 (1973).
39. *James A. T., Martin A. J. P.*, Biochem. J., **50**, 679 (1952).
40. *James D. H., Phillips C. A. G.*, J. Chem. Soc., 1066 (1954).
41. *Janák J.*, Collection Czech. Commun., **18**, 798 (1953).
42. *Juvet R. S., Durbin R. P.*, Anal. Chem., **38**, 565 (1966).
43. *Keulemans A. I. M.*, Gas Chromatography, p. 7, Reinhold, New York (1957).
44. *Klinkenberg A., Sjenitzer F.*, Chem. Eng. Sci, **5**, 258 (1956).
45. *Kouřilová D., Krejči M.*, Chem. Listy, **65**, 742 (1971).
46. *Kováts E.*, Helv. Chim. Acta, **41**, 1915 (1958).
47. *Kováts E.*, Chimia, 22, 459 (1968).
48. *Kováts E.*, Z. Anal. Chem., **181**, 351 (1961).
49. *Krejčí M., Deml M.*, Collection Czech. Chem. Commun., **30**, 3701 (1965).
50. *Krejčí M., Dressler M.*, Chromatog. Rev., **13**, 1 (1970).
51. *Kuhn R., Winterstein A., Lederer E.*, Z. Phisiol. Chem., **197**, 141 (1931).
52. *Leathard D. A., Shurlock B. C.*, Identification Techniques in Gas Chromatography, p. 11, Wiley-interscience, London (1970).
53. *Lovelock J. E.*, Anal. Chem., **33**, 162 (1961).
54. *Lovelock J. E.*, Nature, **189**, 729 (1961).
55. *Lovelock J. E., Gregory N. L.*, in: Gas Chromatography (Brenner N., Collen J. E., Weiss M. D. Eds.), p 219, Academic Press, New York (1962).
56. *Lovelock J. E., Lipsky S. R.*, J. Am. Chem. Soc., **82**, 431 (1960).
57. *Lovelock J. E., Zlatkis A.*, Anal. Chem., **33**, 1958 (1961).
58. *Martin A. J. P., Synge R. L. M.*, Biochem., J., **35**, 1358 (1941).
59. *McCormack J., Tong S. C., Cooke W. D.*, Anal. Chem., **37**, 1470 (1965).

59a. *McNair H. M., Bonelli E. J.,* Basic Gas Chromatography, Consolidated Printers, Berkeley, California (1969).
60. *McReynolds W. O.,* J. Chromatog. Sci., **8**, 685 (1970).
61. *Mohnke M., Saffert W.,* in: Gas Chromatography 1962 (van Swaay, Ed.), p. 216, Butterworths, London (1962).
62. *Morrison M. E., Corcoran W. H.,* Anal. Chem., **39**, 255 (1967).
63. *Morrison M. E., Rinker R. G., Corcoran W. H.,* Anal. Chem., **36**, 2256 (1964).
64. *Munson N. S. B.,* Anal. Chem., 43, No. 13, 28A (1971).
65. *Nelsen F. M., Eggertsen F. T.,* Anal. Chem., **43**, 1387 (1958).
66. *Novak J.,* J. Chromatog., **78**, 269 (1973).
67. *Novak J., Růžičková J.,* J. Chromatog., **91**, 79 (1974).
68. *Novak J., Růžičková J., Wičar S., Janak J.,* Anal. Chem., **45**, 1365 (1973).
69. *Novak J., Vašák J., Janák J.,* Anal. Chem., **37**, 660 (1965).
70. *Page F. M., Wooley D. E.,* Anal. Chem., **40**, 210 (1968).
71. *Penzias G. J.,* Anal. Chem., **45**, 890 (1973).
72. *Penzias G. J., Boyle M. J.,* Intern. Laboratory Nov./Dec., 49 (1973).
73. *Perry S. G.,* Chromatog. Rev., **9**, 1 (1967).
74. *Petitjean D. L., Lantz C. D.,* J. Chromatog., **1**, 23 (1963).
75. *Purnell J. H.,* Gas Chromatography, p. 237, Wiley, London (1962).
76. *Rohrschneider L.,* in: Advances in Chromatography, Vol. 4 (J. C. Giddings, R. A. Keller, Eds.), p. 333, Dekker, New York (1967).
77. *Ryhage R.,* Anal. Chem., **36**, 759 (1964).
78. *Schomburg G.,* in: Advances in Chromatography, Vol. 6, (J. C. Giddings, R. A. Keller, Eds.), p. 211, Dekker, New York (1968).
79. *Scolnick M.,* 6th International Symposium — Advances in Gas Chromatography, Miami, Florida, June 1970.
80. *Simpson C.,* Gas Chromatography, p. 61, Kogan Page, London (1970).
81. *Soják L., Krupčík J., Janák J.,* J. Chromatog., **65**, 93 (1972).
82. *Sternberg J. C., Gallaway E. S., Jones D. T. C.,* Gas Chromatography, 3rd International Symposium, p. 231, Instrument Society of America, Academic Press, New York (1962).
83. *Tesarik K., Krejči M.,* J. Chromatog., **91**, 539 (1974).
84. *Tesarik K., Novotný M.,* in: Gas Chromatographie, 1968 (H. G. Struppe, Ed.), p. 575, Akademie-Verlag GmbH, Berlin (1968).
85. *Tswett M. S.,* Ber. Deut. Botan. Ges, **24**, 316, 384 (1906).
86. *Van Deemter J. J., Zuiderweg F. J., Klinkenberg A.,* Chem. Eng. Sci., 5, 271 (1956).
87. *Van den Heuvel W. J. A., Gardiner W. L., Horning E. C.,* Anal. Chem., **36**, 1550 (1964).
88. *Völlmin J. A., Simon W., Kaiser R.,* Z. Anal. Chem., **229**, 1 (1967).
89. *Wičar S., Novák J.,* J. Chromatog., 53, 429 (1970).

Глава 11. Противоточное распределение

З. ПРОХАЗКА

Институт органической химии и биохимии
Академии Наук ЧССР, Прага

11.1. ВВЕДЕНИЕ

11.1.1. ЭКСТРАКЦИЯ В СИСТЕМАХ ЖИДКОСТЬ — ЖИДКОСТЬ

Метод противоточного распределения, основанный на принципе распределения вещества в системе жидкость — жидкость, известен с 30-х годов. В процессе его совершенствования были разработаны: а) метод непрерывной противоточной экстракции, применяемый главным образом в промышленных целях (он лишь упоминается в этой главе), и б) метод периодического противоточного распределения. Метод противоточного распределения часто называют методом Крейга. В 1944 г. Крейг [2] опубликовал описание первой батареи для противоточного распределения с металлическими элементами*, позволяющей осуществить простой перенос двух несмешивающихся фаз в противоточном режиме. Позднее Крейг и другие авторы сконструировали стеклянные аппараты для противоточного распределения; специальные пробирки для этих аппаратов в настоящее время выпускаются промышленностью.

В пределах одной главы, естественно, нельзя рассмотреть метод противоточного распределения в полном объеме. Мы ограничимся обсуждением целесообразности более широкого его применения в обычных лабораториях, т. е. лабораториях, финансовые возможности которых ограниченны, и лишь упомянем большие дорогие аппараты и сложные методы, которые часто

* Функциональные ячейки аппарата для противоточного распределения в литературе именуют по-разному: в простых конструкциях это делительная воронка, в более сложных — элемент, деталь, пробирка. В этой главе термин «делительная воронка» используется в тех случаях, когда форма и назначение функциональных ячеек действительно соответствуют форме и назначению делительных ячеек, применяемых в препаративной химии. В других случаях, когда целая батарея соответствующих ячеек или элементов перемещается синхронно, применяется термин «пробирка».

используют в специальных целях и для специальных исследований в лабораториях, располагающих не только достаточными финансовыми средствами для приобретения этого оборудования, но и площадями для его размещения. Теоретические описания и выбор методик основываются на едином принципе независимо от сложности используемого аппарата.

Метод противоточного распределения развивался так быстро, что уже спустя всего лишь два десятилетия с момента открытия он уже получил широкое распространение. Однако в настоящее время он используется лишь в тех случаях, когда его не удается заменить каким-либо другим. За последние несколько лет в литературе не появилось новых работ по методике противоточного распределения, опубликовано лишь несколько статей, посвященных практическому применению этого метода. Его лишь изредка используют в аналитических или препаративных целях, главным образом при изучении антибиотиков, пептидов и т. п. Для более детального и глубокого ознакомления с рассматриваемым методом читателю рекомендуется обратиться к подробной монографии Геккера [6]. Дополнительную информацию можно найти также в обзорах [7, 19, 20] и в других монографиях [3, 8, 11, 21]. Наша цель состоит в том, чтобы показать, что данный метод можно с успехом применять и в том случае, когда дорогое оборудование недоступно.

11.1.2. ПРИНЦИПЫ ПРОТИВОТОЧНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ

Экстракция соединения из раствора несмешивающейся жидкостью в делительной воронке хорошо знакома любому химику-органику и биохимику, причем каждый знает, что однократной экстракции бывает недостаточно и что обычно ее повторяют не менее трех раз. Как правило, при экстракции водного раствора, например, эфиром объединенные эфирные вытяжки содержат не только нужное (экстрагируемое) соединение, но и заметное количество воды, а также примеси или компоненты смеси, растворенные в ней (неорганические кислоты, основания, некоторые соли, побочные продукты, исходные соединения и т. д.). Поэтому объединенные эфирные вытяжки промывают водой. При этом, однако, из эфирного слоя извлекается некоторое количество нужного вещества, и аккуратный химик часто пользуется набором из трех делительных воронок, как это рекомендуют некоторые руководства. Двухфазную систему в первой делительной воронке энергично встряхивают, после чего дают смеси отстояться, затем отделяют водный слой и переносят его во вторую воронку, где его смешивают со свежей порцией эфира, а эфирный слой, оставшийся в первой делительной воронке, экстрагируют чистой водой. Таким способом увлеченные вместе с

нужным веществом гидрофильные примеси экстрагируются из эфирной вытяжки в первой делительной воронке, а во второй делительной воронке большая часть оставшегося липофильного вещества переходит из исходного водного слоя в эфир. Эту операцию повторяют еще раз, т. е. водный слой из второй делительной воронки переносят в третью, где его обрабатывают чистым эфиром в третий раз. Водный слой из первой делительной воронки переносят во вторую, к оставшемуся в ней эфирному слою, и смешивают их. К эфирному раствору в первой делительной воронке добавляют свежую воду и смесь энергично встряхивают, при этом из эфира извлекаются последние следы гидрофильных примесей.

Вся эта операция и называется противоточным распределением. Таким образом, в данном случае в процессе противоточного распределения участвуют две фазы — эфирная и водная. Первая фаза все время находится в делительных воронках, а вторая (водная) последовательно переносится из одной воронки в другую, где она подвергается исчерпывающей экстракции. В приведенном примере одна из фаз (эфир) неподвижна, и может сложиться впечатление, что неверно говорить о перемещении жидкостей, движущихся в противоположных направлениях (противоток). Однако в данном случае речь идет об относительном перемещении фаз. Далее мы увидим, что, хотя в некоторых более сложных вариантах противоточного распределения обе фазы действительно перемещаются в противоположных направлениях, в общем случае можно рассматривать неподвижную фазу как фазу, движущуюся бесконечно медленно.

11.1.3. КОНСТАНТА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ

Основной характеристикой, используемой в методе противоточного распределения, является константа распределения K_D (ранее ее называли коэффициентом распределения). Когда две фазы, в одной из которых растворена смесь веществ, перемешивают друг с другом, часть растворенных соединений переходит во вторую фазу, другими словами, растворенные соединения распределяются между фазами. При достаточно длительном перемешивании достигается равновесное состояние, строго определенное для каждого из веществ смеси. Простейшее описание этой ситуации дается законом Нернста, согласно которому вещество А распределяется между несмешивающимися или частично смешивающимися жидкостями с постоянным отношением концентраций. Это отношение, определяемое природой вещества, зависит только от температуры и давления и в идеальном случае не зависит от количества распределяемого вещества. Константу распределения можно определить соотношением

$$K_D\,(p, T, \text{система}) = [\text{A}]\,(\text{орг.})/[\text{A}]\,(\text{водн.}), \qquad (11.1)$$

где [A] (орг.) и [A] (водн.) — равновесные концентрации вещества A в органической и водной фазах соответственно при давлении p и температуре T в двухфазной системе определенного состава. Приведенное уравнение справедливо, если вещество A находится в обеих фазах в одном и том же виде, т. е. не реагирует ни с одной из фаз, не ассоциирует или диссоциирует и не вступает в побочные реакции.

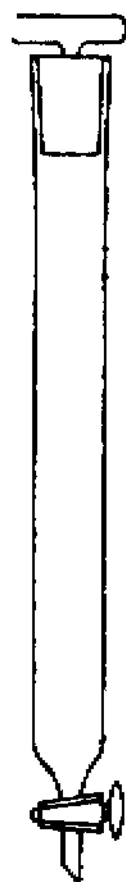


Рис. 11.1. Делительная воронка для определения распределения или отношения количеств распределяемого вещества.

Наиболее удобны воронки объемом 12—15 мл; в них легко смешивать две фазы по 5 мл каждая.

Если общее количество вещества A в каждой фазе характеризуется его аналитической концентрацией c, не зависящей от вида, в котором вещество находится в фазе, то распределение описывают отношением концентраций распределяемого вещества D_c:

$$D_c = c_{A\ (\text{орг.})} / c_{A\ (\text{водн.})}. \qquad (11.2)$$

Полезным параметром может также служить отношение масс (количеств) распределяемого вещества D_m, зависящее от соотношения объемов фаз, в отличие от параметров, описываемых уравнениями (11.1) и (11.2). При измерении относительных масс вещества в обеих фазах системы используют уравнения:

$$D_m = m_{A\ (\text{орг.})} / m_{A\ (\text{водн.})} = p/q = K_D V \qquad (11.3)$$

и

$$p = m_{A\ (\text{орг.})} / (m_{A\ (\text{орг.})} + m_{A\ (\text{водн.})}); \qquad q = \frac{(m_A)_{\text{водн.}}}{(m_A)_{\text{орг.}} + (m_A)_{\text{водн.}}};$$

где V_1 — объем органической фазы, V_2 — объем водной фазы. Далее, $p+q=1$ и $100p$ и $100q$ выражают процентное содержание вещества в органической и водной фазах. Если объемы обеих фаз равны, т. е. $V_1/V_2=1$, то $D_m = K_D$.

Константу распределения легко измерить. Две фазы энергично встряхивают до взаимного насыщения. После этого изме-

ренный объем одной фазы переносят в длинную узкую делительную воронку (рис. 11.1) и растворяют в нем чистое вещество. Концентрация вещества должна быть не слишком велика, поскольку закон Нернста выполняется для идеальных растворов, т. е. при низких концентрациях веществ, при которых не происходит ассоциации молекул в растворе и других отклонений от идеальных условий. Затем в воронку добавляют такой же объем другой фазы и вещество тщательно экстрагируют, периодически медленно (чтобы избежать образования эмульсии) переворачивая воронку. После этого фазы разделяют и в каждой из них определяют количество растворенного вещества. Для этого используют какой-либо селективный аналитический метод, например колориметрию или титрование, либо испаряют растворитель и взвешивают остаток. Если вещество недостаточно чистое, метод взвешивания сухого остатка не может дать точных значений.

Из сказанного выше следует, что чем выше D_m или K_D, тем легче вещество переходит в органическую фазу, т. е. тем полнее оно экстрагируется из водной фазы.

11.2. ПЕРИОДИЧЕСКОЕ ПРОТИВОТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ (МЕТОД КРЕЙГА)

11.2.1. ОСНОВНАЯ МЕТОДИКА (МЕТОДИКА КРЕЙГА)

В этом разделе мы рассмотрим принцип противоточного распределения более подробно. По сути, эта методика ничем не отличается от описанной выше, за исключением того, что используется большее число разделительных ячеек. Представим себе батарею из пяти делительных воронок или пробирок ($z=5$, рис. 11.2, *а*), пронумерованных от $r=0$ до $r=z-1$. Пробирки заполнены равными объемами фаз — органической (более легкой) и водной (более тяжелой), предварительно взаимно насыщенных. В пробирку $r=0$ добавляют некоторое количество вещества и дают ему раствориться, после чего всю батарею пробирок многократно встряхивают до установления равновесия. После установления равновесия в соответствии с данной константой распределения в более легкой фазе содержится часть p исходного количества вещества, в более тяжелой фазе — часть q того же вещества. Пробирки затем наклоняют таким образом, чтобы более легкая фаза переместилась в соседние с ними пробирки справа, а пробирку $r=0$ заполняют свежей порцией легкой фазы. На этом заканчивается первый шаг ($n=1$) противоточного распределения. На рис. 11.1 показано, как после завершения этого шага вещество распределяется между пробирками $r=0$ и $r=1$. Вслед за первым шагом проводится второй ($n=2$):

вновь устанавливается равновесие и происходит перенос фазы. Распределение вещества в двухфазной системе и в пробирках, описываемое уравнением (11.3), показано на схеме. После завершения четырех шагов вещество распределится по всем пяти пробиркам (рис. 11.2, *а*, $n=4$). В этом и состоит основная методика Крейга.

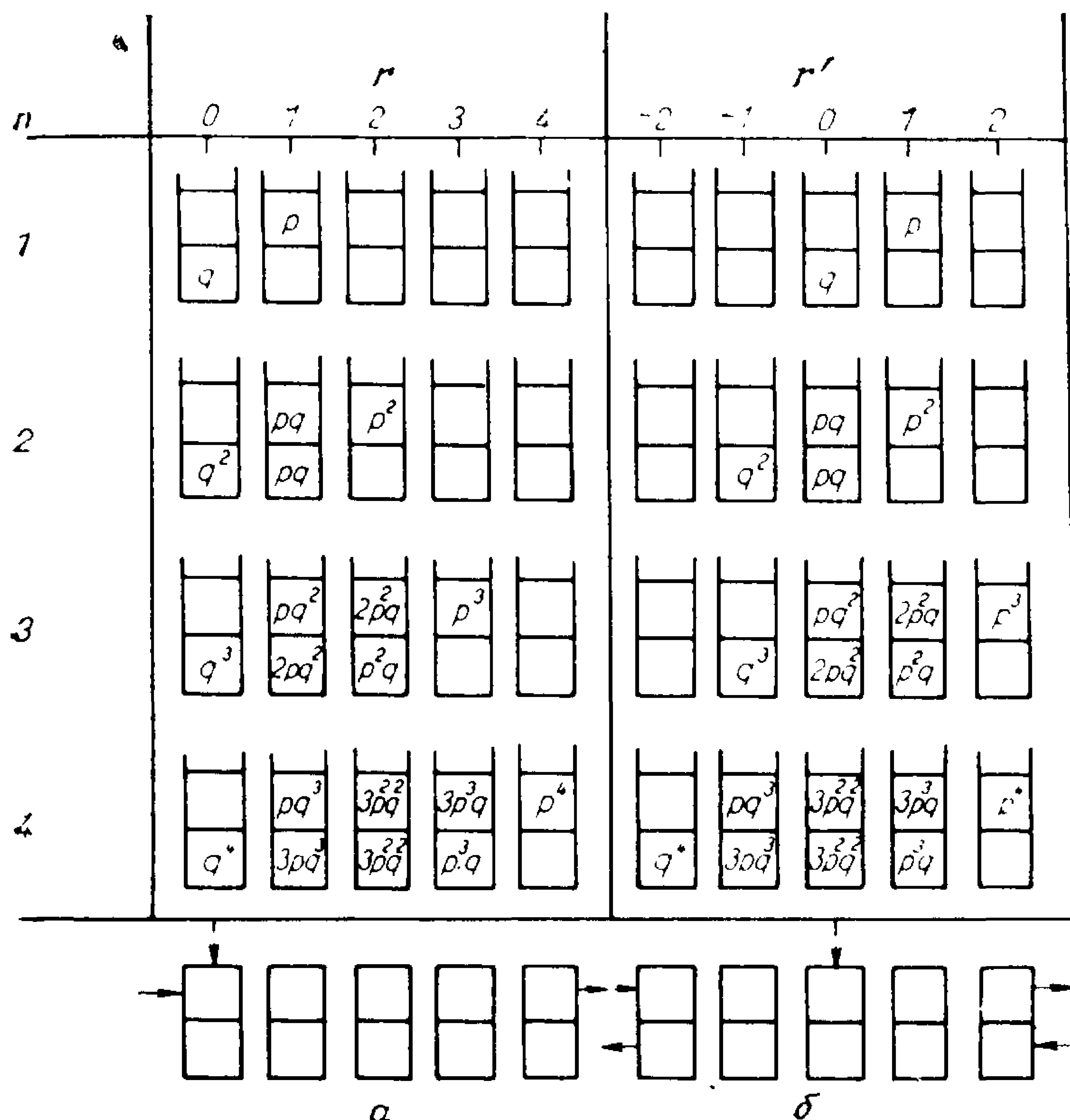


Рис. 11. 2. Схема противоточного распределения при однократном вводе вещества.

Вертикальная стрелка показывает место ввода вещества: *а* — в первый элемент ($r=0$) батареи (движется только верхняя фаза) и *б* — в центральный элемент ($r'=0$) батареи (обе фазы перемещаются в противоположных направлениях).

11.2.2. ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОТИВОТОЧНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ

Распределение вещества после каждого шага (или переноса) можно описать количественно с помощью биномиального уравнения

$$(q+p)^n. \qquad (11.4)$$

Например, после четырех переносов ($n=4$) распределение вещества по пяти пробиркам от $r=0$ до $r=4$ описывается следующими значениями: q^4, $4pq^3$, $6p^2q^2$, $4p^3q$ и p^4. В общем случае количество вещества в любой пробирке r (в обеих фазах суммарно) после n переносов можно рассчитать по уравнению

$$T_{n,r}=[n!/r!\,(n-r)!]\,p^r q^{n-r}=[n!/r!\,(n-r)!]\,[D_m/(1+D_m)^n] \qquad (11.5)$$

Из рис. 11.2 и уравнения (11.4) следует, что, если отношение количеств распределяемого вещества $D_m=1$ (т. е. $p=q$), распределение вещества по батарее пробирок симметрично и описывается гауссианой (кривой нормального распределения), т. е. наибольшая концентрация вещества должна наблюдаться в среднем элементе батареи. В то же время вещества с $1>D_m<1$, особенно обладающие повышенным сродством к одной или другой фазе, должны концентрироваться в крайних слева или справа элементах батареи. Поэтому эту простую методику можно успешно использовать для относительного обогащения веществ, выделенных из природных материалов, или сложных искусственных смесей. Необходимо лишь подобрать такую систему несмешивающихся растворителей, в которой искомое соединение имело бы D_m, равное или очень близкое единице, а другие компоненты характеризовались бы иными величинами этой константы. При таких условиях нужное соединение концентрируется в центре батареи, а примеси по концам. К этому способу мы вернемся позднее.

Если необходимо разделить два вещества А и В, целесообразно воспользоваться следующей методикой.

1. Следует подобрать систему растворителей, в которой среднее значение D_m смеси компонентов должно находиться в интервале 0,2—5, а коэффициент разделения

$$\alpha=K_{D\,(A)}/K_{D\,(B)}=D_{m\,(A)}/D_{m\,(B)} \qquad (11.6)$$

должен быть максимально возможным, во всяком случае не меньше 1,5.

2. Распределение необходимо вести в таких условиях, чтобы произведение величин D_m компонентов смеси было равно или близко к единице, т. е.

$$D_{m\,(A)}D_{m\,(B)}=\beta\approx 1, \qquad (11.7)$$

поскольку в этом случае максимумы концентраций разделяемых веществ в батарее расположатся на наибольшем расстоянии друг от друга и разделение окажется наиболее эффективным.

3. И наконец, оптимальное отношение объемов фаз в системе должно составлять

$$V_{\text{опт}}=1/\sqrt{K_{D\,(A)}K_{D\,(B)}}. \qquad (11.8)$$

Число шагов n (или число пробирок в батарее), необходимое для разделения, зависит от нескольких переменных, а именно: $n=f(\alpha, \beta$, соотношение количеств веществ, степень чистоты, выход).

На рис. 11.3 показано разделение никотинамида и бензамида

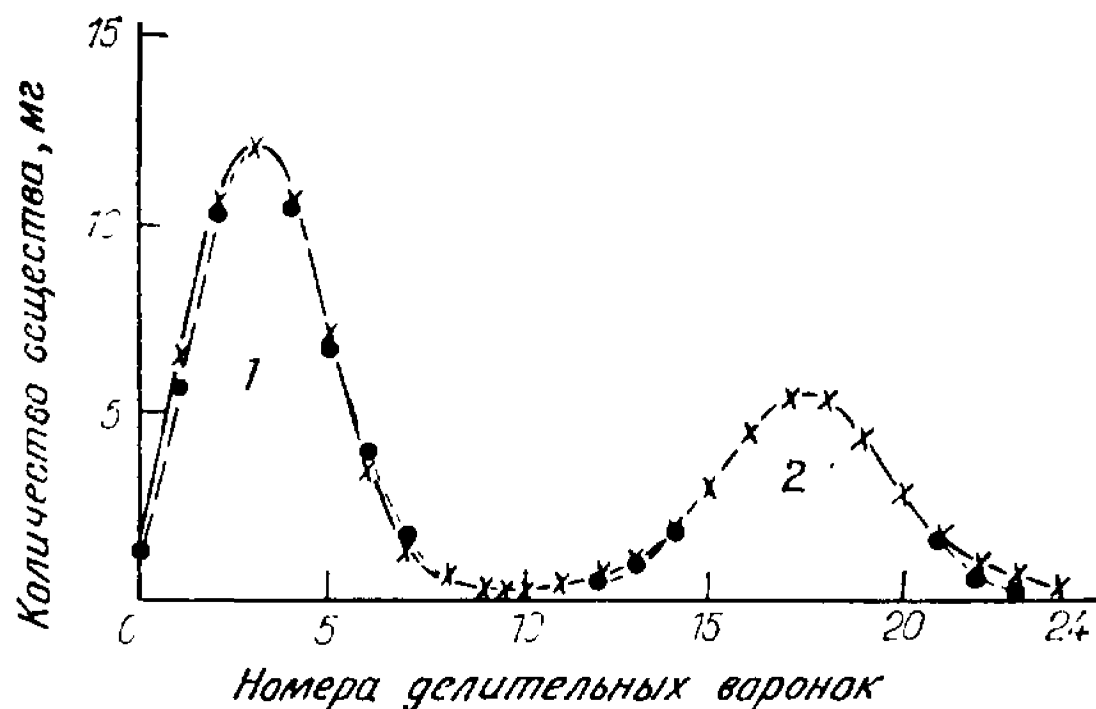


Рис. 11.3. Разделение 50 мг смеси никотинамида (1) и бензамида (2) по основной методике в микроустановке с 24 элементами [6].

Система растворителей этилацетат — вода ($V=1$); температура 20 °С. D_m никотинамида 0,163, D_m бензамида 2,58.

в системе этилацетат — вода. Коэффициент разделения α в данной системе равен примерно 16, и для полного разделения достаточно батареи из 16 пробирок; необходимость в подборе условий, при которых $\beta \approx 1$ [уравнение (11.7)] отсутствует. Однако, если требуется разделить смесь веществ с более близкими значениями D_m (<2), можно воспользоваться табл. 11.1, с помощью которой легко найти число пробирок, необходимых для более или менее полного разделения пар соединений с различными коэффициентами разделения.

Для расчета α или β необходимо знать величины D_m. Определяют их, используя главным образом чистые соединения или исходя из положения максимумов кривых распределения [рис. 11.3 и уравнения (11.11), (11.14) и (11.15)], что весьма трудоемко. Поэтому автор предложил уравнение для приближенного расчета значения α из значений R_f, полученных при хроматографировании на бумаге, в процессе которого разделение идет как чисто распределительный процесс:

$$\alpha = R_{f\,(A)}(1-R_{f\,(B)})/R_{f\,(B)}(1-R_{f\,(A)}). \qquad (11.9)$$

Величину параметра α можно также рассчитать по времени удерживания при хроматографировании методом жидкостной

Таблица 11.1

Число шагов n, соответствующее различным факторам разделения α, и выход чистых соединений при $\beta=1$ [6]

α	n (99,7%)	n (99%)	n (97,5%)	n (95%)	n (90%)	n (80%)	n (70%)	n (60%)	n (50%)
11,0	22								
10,0	24								
9,0	27	21							
8,0	30	24	21						
7,0	35	28	24	21					
6,0	42	33	28	25	21				
5,0	53	42	36	32	27	22			
4,5	61	48	41	36	31	25	21		
4,0	72	57	49	43	37	29	25	21	
3,5	89	70	60	53	45	36	31	26	22
3,0	116	92	79	70	59	48	40	34	29
2,7	143	113	97	86	73	59	49	42	36
2,4	185	146	126	111	94	76	64	55	46
2,2	229	181	155	137	117	94	79	67	57
2,0	292	230	198	175	149	120	101	86	72
1,9	346	274	236	208	177	142	119	102	87
1,8	413	326	281	248	211	169	143	121	103
1,1	15652	13700	10841	9509	8078	6504	5473	4662	3966

колоночной хроматографии:

$$\alpha=(t_{R\,(A)}-t_{R\,(F)})/(t_{R\,(B)}-t_{R\,(F)}), \qquad (11.10)$$

где $t_{R(A)}$, $t_{R(B)}$ и $t_{R(F)}$ — время удерживания соединений А и В и фронта растворителя соответственно.

Следует также помнить, что вещества с $K_D=1$ при хроматографировании на бумаге с водной неподвижной фазой характеризуются величинами R_f около 0,7—0,8.

Преимущество методики Крейга состоит в том, что, зная номер пробирки с максимальной концентрацией соединения, можно вычислить D_m, и наоборот. Кроме того, можно предварительно рассчитать, в каких элементах батареи находится какая-то конкретная доля (например, 99,7% в описанном ниже

случае) общего количества выделяемого соединения.

$$D_m = (r_{max} + 0{,}5)/(n - r_{max} + 0{,}5), \qquad (11.11)$$

$$r_{max} = [(n + 0{,}5)D_m - 0{,}5]/(1 + D_m), \qquad (11.12)$$

$$\Delta r_{99,7} = 6n\,[D_m/(1 + D_m)^2] \quad (\text{для } D_m = 1) \qquad (11.13)$$

При использовании аппаратов и методик с числом переносов n выше 100 величину параметра D_m можно рассчитать из приближенного уравнения

$$D_m = r_{max}/(n - r_{max}) \qquad (11.14)$$

или из концентраций распределяемого вещества в двух соседних элементах батареи

$$D_m = (y_{n,r}/y_{n,r-1})\,[r/(n + 1 - r)], \qquad (11.15)$$

где $y_{n,r}$ и $y_{n,r-1}$ — количества вещества в двух соседних пробирках. Если применяются более сложные методы (см. далее), некоторые из этих уравнений следует модифицировать. Читателям, интересующимся такими расчетами, следует обратиться к монографии Геккера [6].

11.2.3. АППАРАТ

Простейший аппарат представляет собой батарею из обычных делительных воронок, укрепленных на специальном штативе (рис. 11.4). Сконструирован также аппарат, в котором делительные воронки, жестко закрепленные на подобном штативе (пробирки плотно закреплены), могут вращаться вместе со штативом вокруг горизонтальной оси, что обеспечивает одновременное перемешивание во всех воронках. Работать при большом числе переносов заметно легче, если используются специально сконструированные двойные или тройные делительные воронки (рис. 11.5). При работе с этими воронками обычно переносится нижняя фаза. Сконструирован, однако, аппарат со специальными делительными пробирками, в котором верхняя фаза автоматически декантируется в следующую пробирку одновременно из всех пробирок. Мы приведем лишь схемы двух типов пробирок (рис. 11.6 и 11.7), из которых можно собрать аппарат с большим числом таких элементов. Простейший и наиболее практичный аппарат с 20 пробирками изображен на рис. 11.8. Аппарат такого типа с 10—20 пробирками пригоден для выбора и оценки систем растворителей, измерения величины D_m, контроля чистоты соединений, быстрого препаративного обогащения одного из компонентов смеси (в мягких условиях) и даже для полного разделения веществ, если их константы распределения достаточно различаются (ср. с. рис. 11.3).

На рис. 11.9 показан более сложный аппарат, выпускаемый промышленностью. Это великолепный полностью автоматизированный аппарат с программным управлением, перемещение

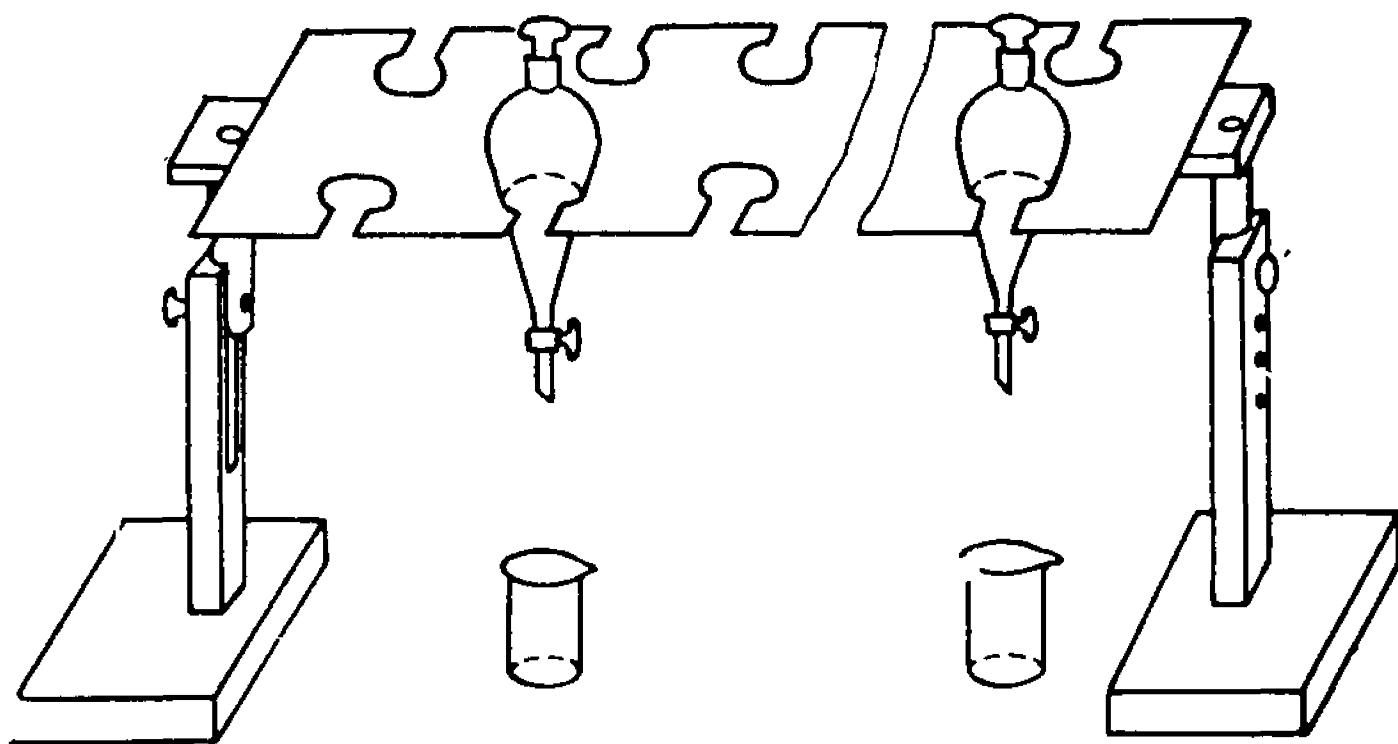


Рис. 11.4. Штатив для большого числа делительных воронок.

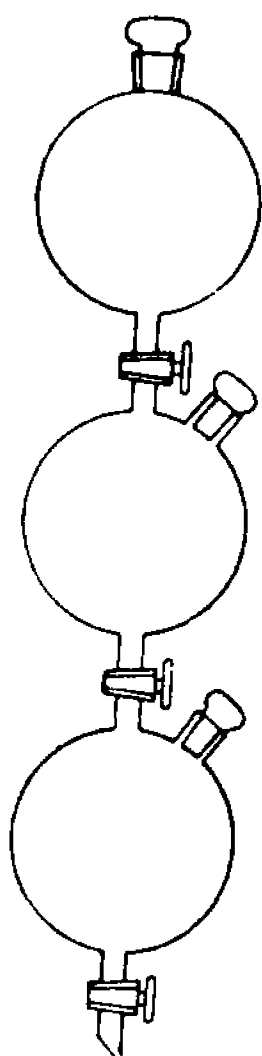


Рис. 11.5. Тройная делительная воронка.

верхней и нижней фаз в нем можно осуществлять независимо и можно запрограммировать методики с различными вариантами переноса. Информацию о других аппаратах этого типа можно найти в рекламной литературе. Среди фирм, изготавливающих такое оборудование, наиболее известны: Brinkman Instruments, Inc., Westbury, N. Y., U.S.A.; E—C Apparatus Corp.,

Philadelphia, U.S.A.; A. Gallenkamp and Co., Ltd., London, England; H. O. Post Scientific Instruments Co., Middle Village, N. Y., U.S.A.; Laborec, F. Schmidiger, Basel, Switzerland; Pope Scientific, Inc. Fairfield, N J., U.S.A.

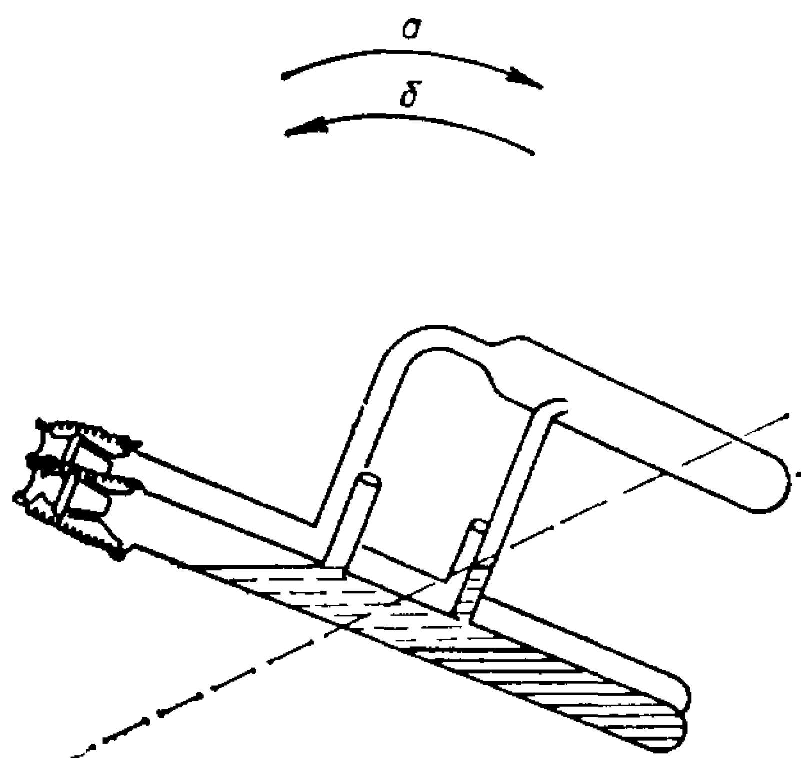


Рис. 11.6. Две спаянные модифицированные пробирки из батареи для противоточного распределения [4] в основном положении (при заполнении батареи) и при разделении фаз после встряхивания.

Верхняя фаза декантируется при повороте пробирок в направлении *а* относительно положения основной пробирки (закрыта пробкой); далее пробирки поворачиваются в положение, показанное штриховой линией (направление *б*), и вновь возвращаются в исходное положение; в процессе такого качания устанавливается равновесие.

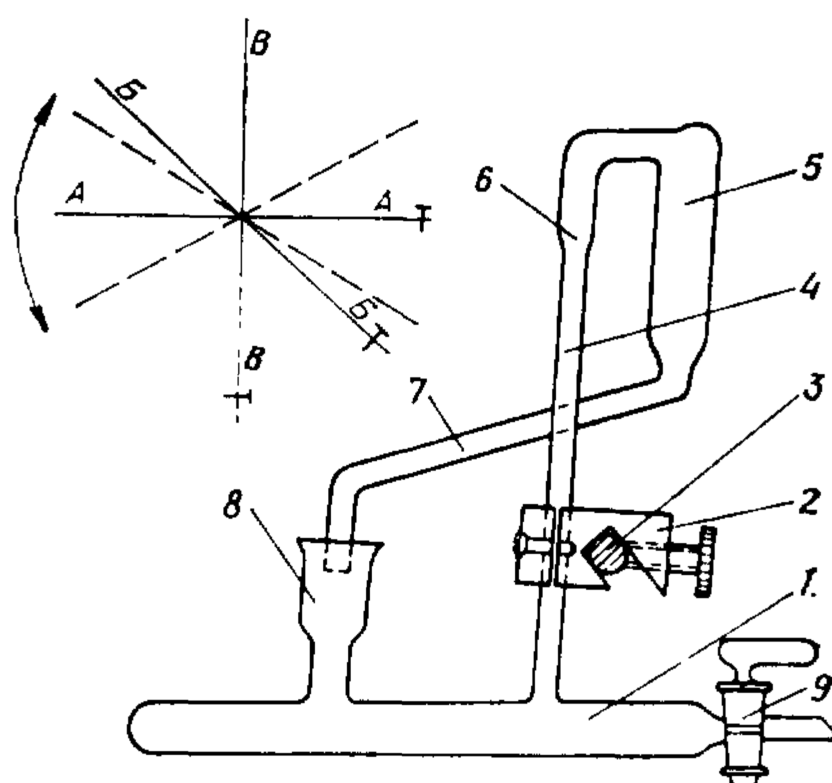


Рис. 11.7. Пробирка из батареи аппарата для противоточного распределения [5].

1 — основная пробирка для встряхивания фаз; *2* — зажим; *3* — ось; *4* — трубка для декантации; *5*, *6* — емкости для декантируемой верхней фазы; *7* — трубка для переноса декантируемой фазы в следующий элемент; *8* — воронка для сбора декантируемой фазы или для отбора проб для анализа; *9* — кран. Равновесие достигается качанием пробирок в плоскости *А* в направлении, показанном стрелками; *Б* — положение для разделения фаз; *В* — положение для переноса верхней фазы.

11.3. ВАРИАНТЫ МЕТОДОВ ПРОТИВОТОЧНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ

Согласно основному методу, описанному выше, распределение заканчивается, когда подвижная фаза из первой пробирки попадает в последнюю пробирку. Этот метод можно успешно модифицировать и повысить коэффициент, повторяя разделение на том же самом аппарате или проводя дополнительное фракционирование так называемыми методами извлечения. В этих процессах число переносов, а следовательно, и эффективность разделения могут превышать предел $n=z-1$, характерный для основной методики (при данном числе элементов z).

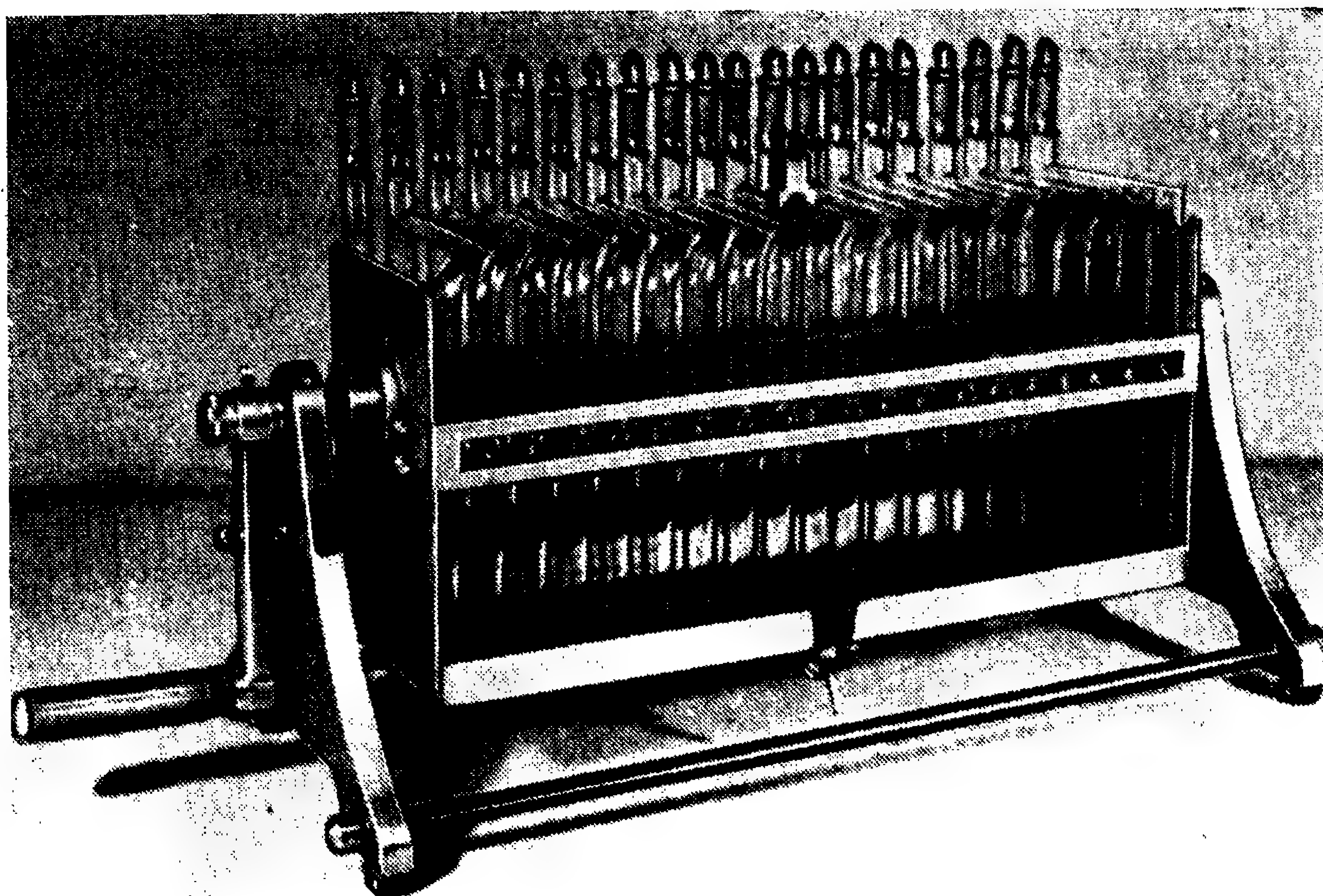


Рис. 11.8. Аппарат для противоточного распределения из 20 элементов.

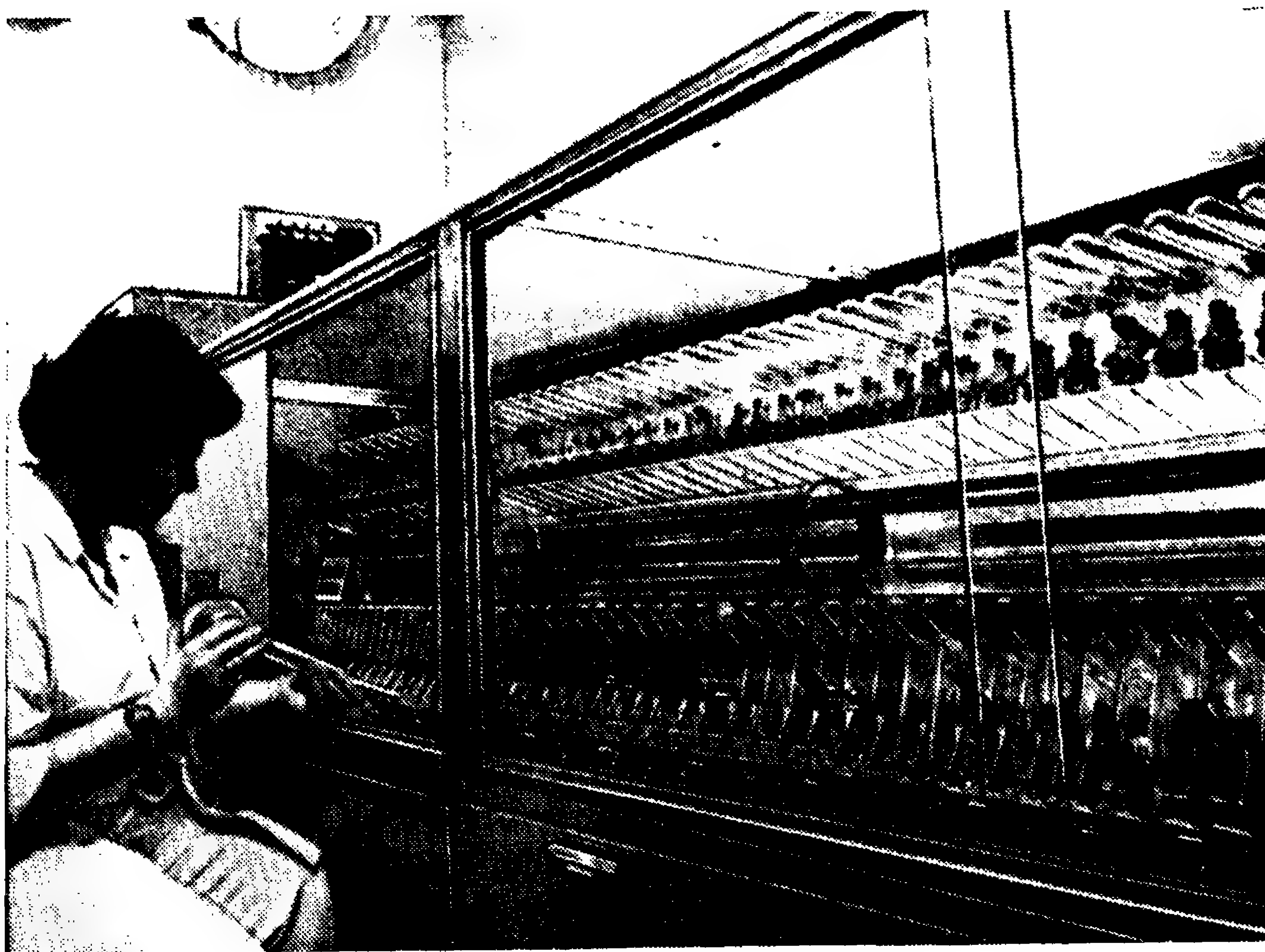


Рис. 11.9. Промышленный аппарат для противоточного распределения Quickfit Steady State Countercurrent Distribution Machine.

11.3.1. СПОСОБ РЕХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ

После завершения основной процедуры оба концевых элемента батареи соединяют друг с другом. При этом подвижная фаза из последней пробирки всегда переносится в первую пробирку. Естественно, этот вариант метода пригоден лишь в том случае, если более «подвижные» распределяемые вещества не обгоняют «отстающие» и если уже разделенные вещества не смешиваются вновь. Другими словами, применение этого варианта метода ограничено в связи с тем, что с возрастанием числа n происходит уширение кривой распределения, и используют этот метод только для разделения веществ, которые очень медленно движутся вместе с подвижной фазой.

11.3.2. СПОСОБ ОДНОКРАТНОГО ИЗВЛЕЧЕНИЯ

Этот способ просто продолжает основную методику, он аналогичен проявительной жидкостной хроматографии. По окончании разделения по основной методике в первую пробирку вво-

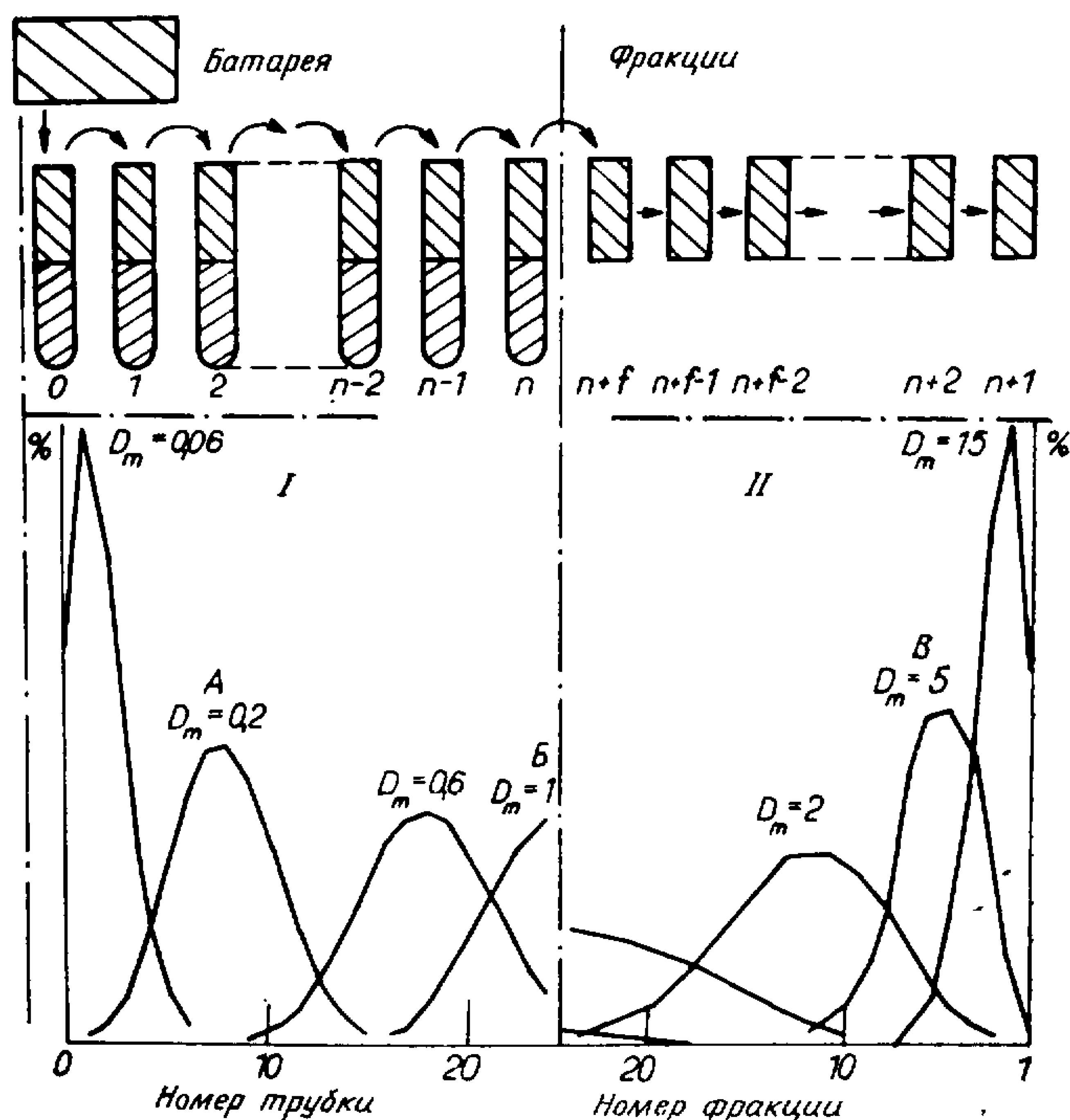


Рис. 11.10. Разделение по методу Крейга (24 переноса) с последующим однократным извлечением, проведенное в аппарате с 24 элементами [19].

I — расчетные кривые распределения с разными величинами соотношения количеств соединений в фазах системы в аппарате; *II* — кривые распределения соединений с более высокой разностью этих же величин в собранных фракциях.

дят свежую порцию подвижной фазы, а подвижную фазу из последней пробирки собирают так же, как собирают фракции, поступающие из хроматографической колонки (см. рис. 11.10). Процесс можно продолжать сколь угодно долго. Для веществ, которые остаются в аппарате после завершения разделения, кривые распределения можно рассчитать с помощью уравнения (11.5), а для расчета кривых распределения собранных фракций следует воспользоваться другим уравнением (см., например, монографию [6]).

11.3.3. «ЖЕСТКИЙ» СПОСОБ РАЗДЕЛЕНИЯ

После завершения разделения по основной методике подвижную фазу в первую пробирку больше не добавляют, но перенос фаз продолжают, пока не соберут всю подвижную фазу, как при однократном извлечении. Эта методика подобна хроматографированию на колонке до пересыхания колонки. С помощью этого способа можно осуществить не более $n=2z-1$ переносов и собрать z фракций каждой фазы.

11.3.4. МЕТОД ДВОЙНОГО ИЗВЛЕЧЕНИЯ

В отличие от описанных выше способов этот вариант метода предусматривает введение свежих порций обеих фаз, так что разделение можно проводить с любым числом переносов независимо от числа пробирок. Сначала разделение проводят по основной методике. Если конструкция аппарата позволяет, то можно использовать истинный противоточный режим, вводя исходную смесь в центральный элемент батареи (рис. 11.2, *б*). При этом удобно пронумеровать пробирки, начиная от центра батареи, так чтобы центральная пробирка, в которую вводят исходную смесь разделяемых веществ, была обозначена $r'=0$. Пробирки, расположенные по направлению движения легкой фазы, нумеруются положительными числами, а пробирки, расположенные в обратном направлении, — отрицательными: $r'=\pm(z-1)/2$ (где z — число пробирок). После ввода вещества в центральную пробирку смесь перемешивают до достижения равновесия и переносят верхние легкие фазы на одну пробирку вправо ($n=1$). Далее всю батарею вновь встряхивают, чтобы установилось равновесие, и тяжелые нижние фазы переносят на одну пробирку влево ($n=2$). После следующего встряхивания верхние фазы сдвигаются вправо ($n=3$) и т. д. Из рис. 11.2, *б* видно, что при $n=z-1$ распределение вещества в пробирках идентично распределению, получаемому при применении основной методики (рис. 11.2, *а*). При следующем переносе ($n=5$ в данном примере, рис. 11.11), т. е. после встряхивания и переме-

щения легких фаз вправо, часть верхних фаз, содержащих p^5 исходного количества вещества, выводят из батареи. Эту фракцию нумеруют как $\rho=0$. Одновременно освобождающееся коли-

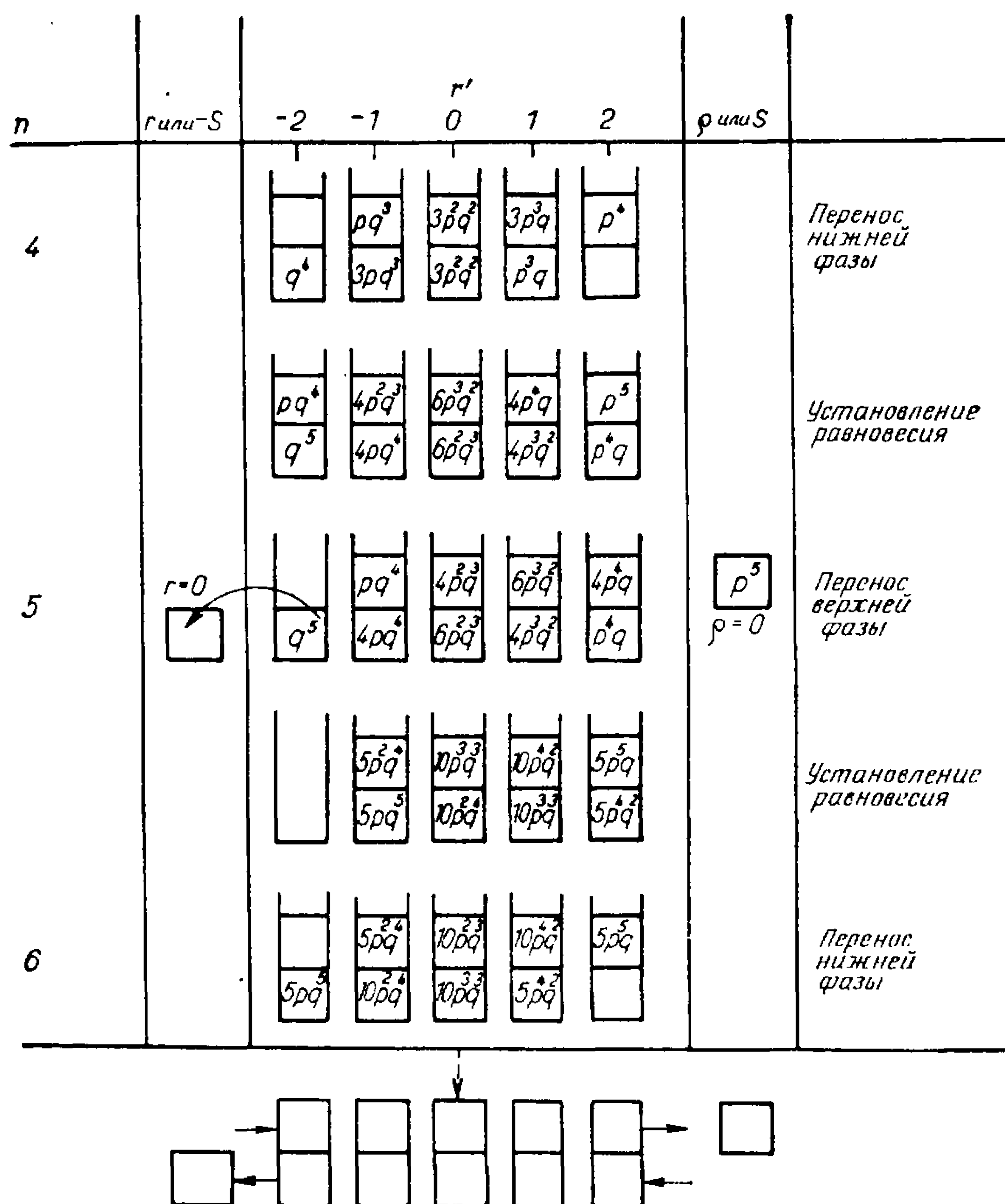


Рис. 11.11. Принципиальная схема метода двойного извлечения.

чество q^5 вещества в тяжелой фазе выводится из батареи с левой стороны; эту фракцию нумеруют как $r=0$. На этом завершается пятый шаг ($n=5$). Шестой шаг ($n=6$) начинается с встряхивания и установления равновесия и заканчивается переносом нижних фаз влево. В результате обе концевые пробирки батареи содержат только одну фазу, и они заполняются соответствующими количествами второй фазы (верхней фазы на левом конце батареи и нижней фазы — на правом, см. рис. 11.11,

$n=6$). Седьмой шаг ($n=7$) вновь начинается со встряхивания и переноса легкой фазы вправо; одновременно верхняя и нижняя фазы отводятся из крайних левой и правой пробирок батареи (фракции $\rho=1$ и $r=1$). Следующий шаг вновь приводит к распределению вещества по всем пробиркам в батарее. Разделение можно продолжать сколь угодно долго. Если число пробирок мало, например, лежит в интервале от 5 до 15, этот метод позволяет тщательно очистить от примесей лишь одно соединение (с $D_m=1$); при большом числе пробирок, например 15—30, он позволяет провести качественное разделение двух соединений с коэффициентом разделения 4 и выше.

11.3.5. МЕТОД О'КИФФА [7, 14]

Описываемый способ представляет собой один из вариантов метода непрерывного противоточного распределения: смесь, подлежащую разделению, вводят в равных количествах в центральную пробирку батареи при каждом шаге необходимое число раз. Сам по себе этот процесс является периодическим, поскольку перемещение фаз производится периодически, а не непрерывно, как в рассмотренных выше примерах. Рассмотрим один из вариантов методики О'Киффа. Батарея включает 5 пробирок, пронумерованных, как показано на рис. 11.12. Пробирки заполняются обеими фазами. Центральная пробирка $r'=0$ заполняется одной долей разделяемой смеси, либо в чистом виде, либо в виде раствора в минимальном количестве легкой фазы. На концах батареи располагают резервуары $+S$ и $-S$ (номера этих резервуаров $r'=\pm(z-1)/2$. Батарею встряхивают до тех пор, пока в системе не установится равновесие и легкие фазы не переместятся на одну пробирку вправо. После этого вновь проводят встряхивание и перемещают тяжелые фазы на одну пробирку влево. Оба таких шага вместе составляют один цикл. Крайние пробирки наполняются соответствующими фазами ($N=1$). Затем в центральную пробирку вводят вторую (равную) порцию разделяемой смеси и батарею вновь встряхивают. В этот момент обе фазы в пробирках под номерами $r'=\pm1$ содержат вещество, попавшее из первой порции разделяемой смеси, а фазы в пробирке 0 содержат вещество из обеих (и первой, и второй) порций разделяемой смеси. На рис. 11.12 это отмечено штриховкой. Теперь легкие фазы снова перемещаются на одну пробирку вправо, после установления равновесия нижние фазы сдвигаются на одну пробирку влево. После завершения второго цикла разделения вещество из первой порции смеси распределяется по всем пяти пробиркам, а вещество из второй порции смеси — по трем центральным пробиркам батареи. Третий цикл ($N=3$) начинается с добавления свежей порции разделяемой смеси в централь-

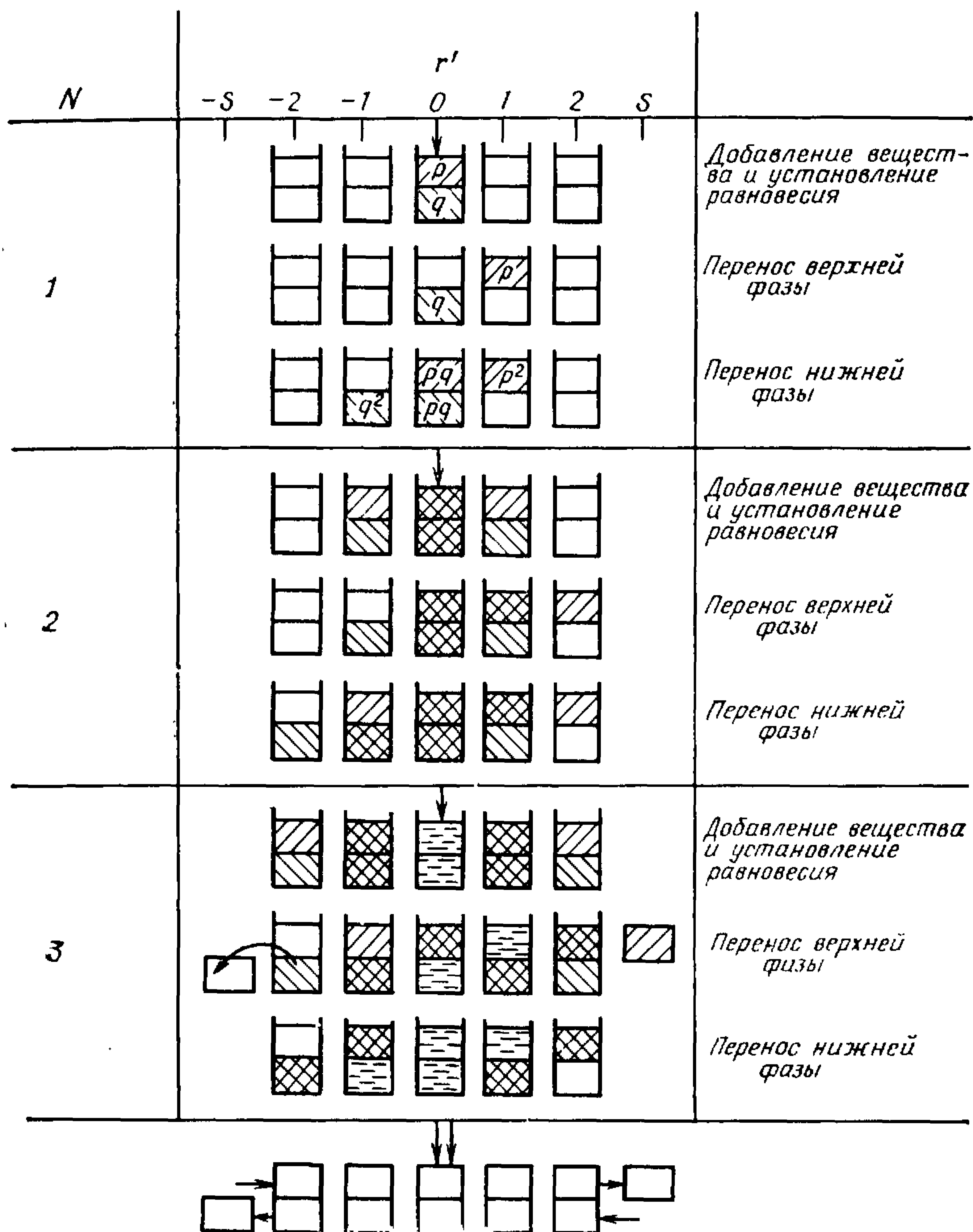


Рис. 11.12. Схема методики О'Киффа (смесь веществ повторно добавляется в центральную пробирку батареи) [7].

Штриховка показывает распределение добавленных веществ между двумя фазами в одном цикле.

ную пробирку. После переноса верхних фаз вправо первая фракция вещества (обогащенная компонентом с большим сродством к верхней фазе) выводится из аппарата в резервуар $+S$. Нижняя фаза из крайней левой пробирки также выводится в резервуар $-S$. Вновь с помощью встряхивания достигают равновесия, тяжелые фазы при этом сдвигаются влево, а крайние

пробирки заполняются соответствующими свежими фазами, т. е. свежая порция легкой фазы добавляется в пробирку —2, а свежая порция тяжелой фазы — в пробирку +2. На этом третий цикл заканчивается. Далее батарею готовят к введению четвертой порции разделяемой смеси в центральную пробирку и дальнейшему разделению. Очевидно, что метод идентичен методу двойного извлечения (или альтернативного извлечения), если исключить повторное добавление разделяемой смеси веществ в центральную пробирку. Этим методом можно проводить разделение, располагая лишь простыми делительными воронками [14]. Не обязательно, чтобы разделяемая смесь вводилась в центральную пробирку; если это более удобно, ее добавляют в какую-либо другую пробирку внутри батареи. В резервуары $+S$ и $-S$ собираются фазы, обогащенные одним из компонентов (бинарные смеси), если произведение параметров распределения β близко к единице.

11.3.6. СПОСОБ ВАТАНАБЭ — МОРИКАВЫ [22]

Этот вариант метода отличается от предложенного О'Киффом лишь тем, что смесь компонентов вводят в крайнюю пробирку. Если смесь вводят не в крайнюю, а в какую-нибудь другую пробирку, можно считать, что методика идентична описанной в разд. 11.3.2.

В разд. 11.3 описаны лишь несколько наиболее важных и наиболее общих модификаций метода противоточного распределения. Дополнительные варианты и модификации можно найти в литературе.

11.4. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ПРОТИВОТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ

Самые большие затруднения при противоточном распределении вызывает образование эмульсий. Если выбранная двухфазная система образует эмульсию, которая не разделяется достаточно быстро (максимум 5—10 мин) и четко, следует начать поиск другой системы, не образующей эмульсии; однако факторы разделения и распределения в этой новой системе не должны слишком отличаться от найденных в первоначально выбранной системе. Если подобрать такую систему не удается, следует попробовать применить другие методы разделения или найти такой способ предварительной обработки разделяемой смеси, который позволил бы разрушить эмульсию или удалить эмульгирующий компонент. Образование эмульсий не только удлиняет время, необходимое для разделения фаз после встряхивания, но и уменьшает перенос веществ между фазами из-за концентриро-

вания вещества на границе раздела фаз. По той же причине мы рекомендуем при установлении равновесия не интенсивное встряхивание, а медленное покачивание пробирок. Другим важным фактором является число переворотов или покачиваний пробирок, необходимое для достижения равновесия. При этом отнюдь не безразлично, в какой фазе вещество находится и в какую фазу оно должно перейти. Так, например, если прегнен-

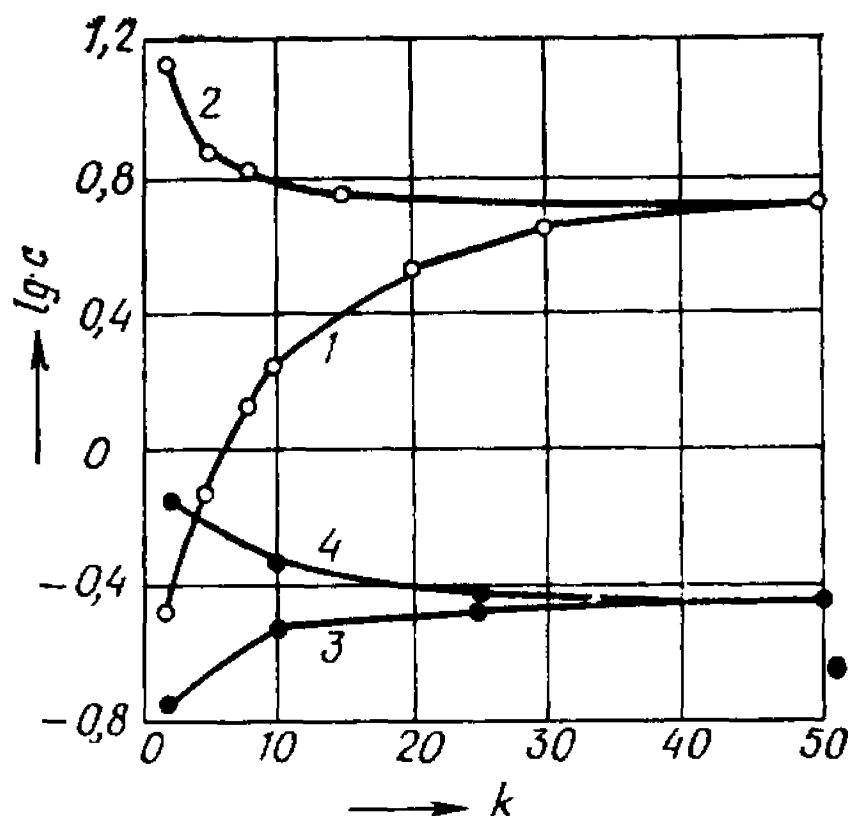


Рис. 11.13. Примеры установления равновесия в зависимости от числа качаний (k) [1].

1, 2 — бензилпенициллин в системе эфир — 3М фосфатный буферный раствор, pH 4,60; 3, 4 — n-оксибензилпенициллин в той же системе, pH 4,9. Кривые с нечетными номерами показывают отношение концентраций веществ в обеих фазах, наблюдаемое в тех случаях, когда вещество растворено в верхней фазе; кривые с четными номерами показывают отношение концентраций веществ в обеих фазах, наблюдаемое в тех случаях, когда вещество растворено в нижней фазе.

4-дион-3,20 растворен в 20 мл верхней неполярной фазы системы вода — этанол — 2,2,4-триметилпентан (состав верхней фазы: 0,011 воды, 0,142 этанола, 0,847 триметилпентана; состав нижней фазы: 0,278 воды, 0,671 этанола, 0,051 триметилпентана) и раствор встряхивают с таким же количеством полярной обогащенной водой фазы, равновесие устанавливается уже через 5 мин. Однако, если этот стероид растворен в нижней обогащенной водой фазе и его необходимо перевести в верхнюю фазу, для достижения равновесия требуется свыше 20 ч [9]. Рис. 11.13 иллюстрирует процесс установления равновесия в системе, содержащей два антибиотика. В большинстве случаев для установления равновесия достаточно от 3 до 50 переворотов пробирки.

Влияние различий в структуре распределяемых соединений на величины их констант распределения наиболее заметно в системах с плохо смешивающимися фазами. Поэтому мы рекомендуем выбирать системы на основе жидкостей, обладающих низкой взаимной растворимостью, конечно, если константы распределения в таких системах не будут изменяться слишком сильно. Улучшить разделение можно также, получив более липофильные производные разделяемых соединений, для разделения которых необходима система с более липофильной органической фазой, которая в свою очередь меньше смешивается с

водной фазой. По тем же причинам обычно рекомендуется подавлять диссоциацию ионогенных веществ соответствующим подбором системы.

Поскольку смешиваемость фаз увеличивается с увеличением температуры, очевидно, что для лучшего разделения смеси целесообразно проводить разделение при пониженных температурах и выбирать системы с фазами, максимально различающимися по плотности. Наконец, следует выбирать растворители с низкой вязкостью, достаточной поверхностной активностью и умеренной летучестью.

11.5. АНАЛИТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ПРОТИВОТОЧНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ

В разд. 11.2.2 было показано, что метод противоточного распределения достаточно хорошо поддается математическому описанию, т. е. если известны константы распределения, можно рассчитать количества индивидуальных компонентов смеси в каждой пробирке аппарата заранее. По этой причине метод противоточного распределения можно использовать для определения

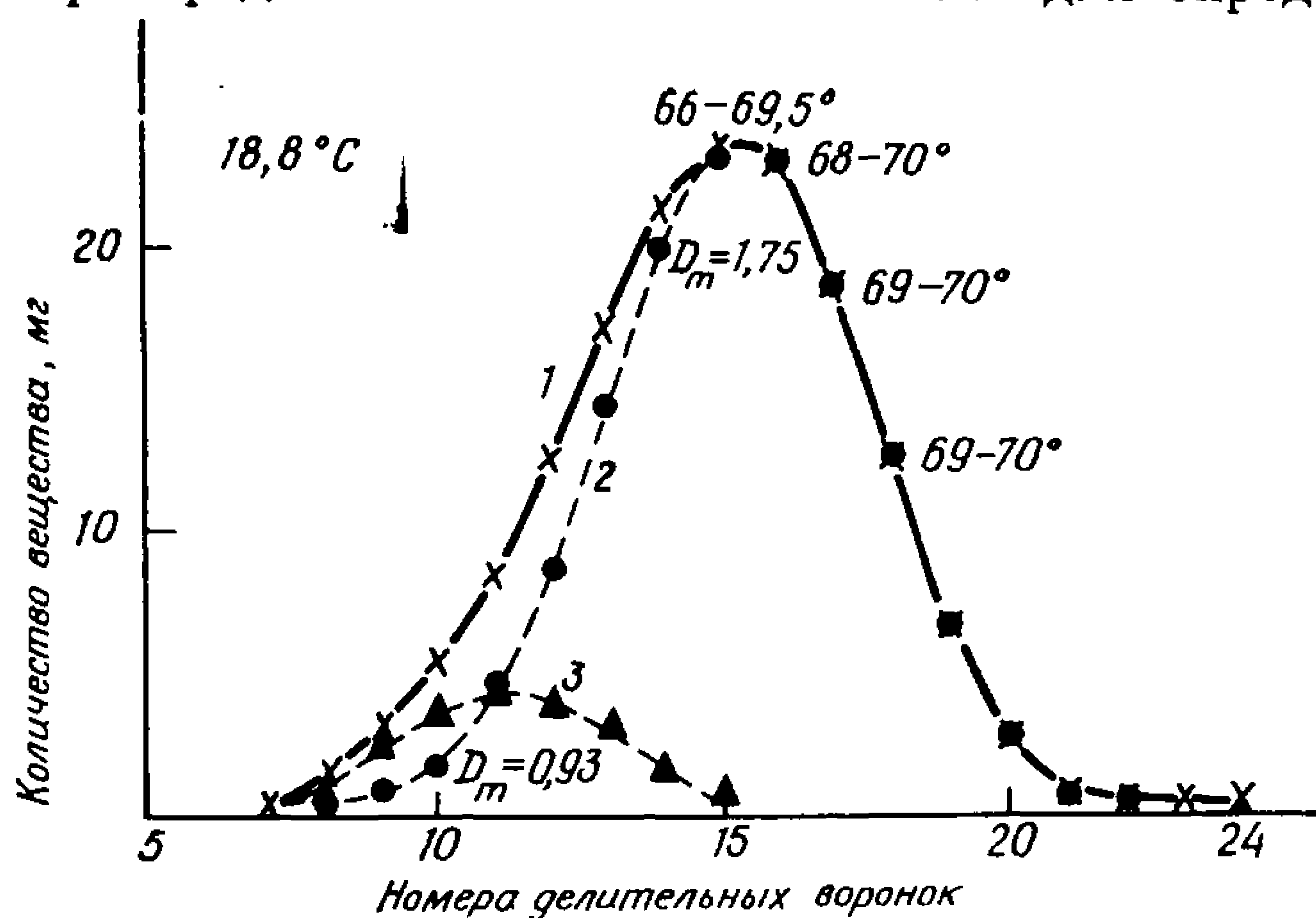


Рис. 11.14. Противоточное распределение стеариновой кислоты в системе изооктан — 94%-ный метанол [6].

Основная методика, $V=0,74$; 1 — экспериментальная кривая; 2 — расчетная кривая для $D_m=1,75$; 3 — разность между экспериментальной и расчетной кривыми и значение D_m (0,93) примеси, найденное из этой разности. Цифры над кривой — температуры плавления фракций.

степени чистоты выделенных компонентов (или индивидуального соединения). Осуществляется это определение следующим образом. *а*. Разделение методом противоточного распределения проводят в аппарате, содержащем по меньшей мере 10—20 про-

бирок. Условия разделения должны быть оптимальными: взаимное насыщение фаз, отсутствие эмульсий, постоянство объемов фаз в пробирках в процессе переноса, достижение равновесия на каждой стадии, константа распределения близка к единице или, если анализируются два соединения, α и β должны быть близки к единице и т. д. *б*. Определяют количество вещества в каждой пробирке и строят кривую распределения. *в*. По максимуму на кривой распределения в соответствии с уравнением (11.11) или (11.15) рассчитывают сначала значение D_m, после чего по уравнению (11.15) рассчитывают теоретическую кривую распределения. Совпадение обеих кривых говорит о чистоте анализируемого соединения. Если кривые не совпадают, то, используя различия между ними, можно построить кривую распределения примесей. Поскольку площади под этими кривыми пропорциональны количествам веществ, то можно рассчитать количество примесей и определить константу распределения примеси (рис. 11.14).

11.6. ПРЕПАРАТИВНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА

Для полного разделения веществ с близкими константами распределения необходим аппарат с большим количеством пробирок. Для простого обогащения смеси компонентом (например, растительным экстрактом), особенно если константы распределения компонентов не слишком схожи, достаточно небольшого числа пробирок. Метод противоточного распределения часто удобно использовать в качестве начальной стадии фракционирования до хроматографического разделения больших количеств веществ (граммов и более), поскольку фракционирование при этом проходит в мягких условиях, не вызывающих денатурации или необратимой сорбции вещества на активном сорбенте. Таким способом можно быстро обогащать большие количества смесей, пользуясь лишь обычными делительными воронками; расход растворителя при этом относительно невелик. Кроме того, за процессом обогащения или разделения можно следить с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ), а результат эксперимента можно математически предсказать до его окончания.

11.7. НЕПРЕРЫВНЫЕ МЕТОДЫ

Для разделения больших количеств веществ, особенно в промышленных масштабах, целесообразнее пользоваться аппаратом для непрерывного противоточного распределения. Разработанные Янтценом и Ван Диком [7] способы непрерывного противоточного распределения по существу аналогичны описанным выше методам О'Киффа и Ватанабэ — Морикавы (с той разницей,

что фазы непрерывно перемещаются друг относительно друга). В литературе описаны наиболее известные аппараты: аппарат для разделения колоночным методом по Шейбелю [17] или Ромечу [16], дисковый экстрактор сотового типа для противоточного разделения смесей по Сигнеру [18] и Ричарду [15] (см. также [6]).

11.8. ПРИМЕРЫ МЕТОДИК ПРОТИВОТОЧНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ

11.8.1. ОБОГАТИТЕЛЬНОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ ОДНОГО КОМПОНЕНТА ИЗ СЛОЖНОЙ РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ В АППАРАТЕ С 20 ПРОБИРКАМИ

Смесь, образующуюся при гидроксилировании дегидроэпиандростерона из ткани картофельного клубня (освобожденную от липофильных компонентов экстракцией легким петролейным эфиром) и содержащую, кроме целевого продукта, часть непрореагировавшего исходного материала, побочные продукты реакции и некоторые неидентифицированные примеси из картофельной массы, подвергали противоточному распределению в аппарате Крейга, снабженном 20 пробирками (рис. 11.8). Лучшей системой растворителей оказалась смесь бензол — эфир/этанол — вода (35 : 15/25 : 25); эта система была выбрана в результате предварительного разделения в делительной микроворонке, контролируемого с помощью ТСХ. Все пробирки аппарата, кроме нулевой, были заполнены нижней, неподвижной фазой (по 10 мл в каждой), насыщенной верхней, подвижной фазой. В пробирку 1, которая служила для завершения насыщения нижних фаз в ходе эксперимента, было введено 10 мл чистой верхней фазы, насыщенной нижней. Образец, подлежащий обогащению (3,2 г), растворяли в примерно 8 мл верхней фазы и 9 мл нижней фазы (обе фазы предварительно взаимно насыщали), смесь вносили в первую пробирку аппарата (0) и начинали первый цикл разделения, включающий 50 качаний, разделение фаз и декантацию верхних фаз в следующие пробирки. После добавления свежей порции верхней фазы в пробирку 0 процесс продолжали до завершения основного процесса. Если объем нижней фазы в какой-либо пробирке слегка уменьшался, то его доводили до 10 мл свежей порцией нижней фазы. После окончания основного процесса проводилось однократное извлечение, и разделение продолжали до тех пор, пока не было собрано 20 фракций верхней фазы (фракции I′—20′). Фракции в аппарате были пронумерованы от 0 до 19 соответственно номерам пробирок. Аликвотные части (по 10 мкл) каждой органической фазы анализировались методом ТСХ на силикагеле (20×20 см).

Элюирование велось смесью хлороформ — метанол (95 : 5), обнаружение — раствором хлорида сурьмы(III). Результат противоточного распределения представлен на рис. 11.15. В соответствии с результатами анализа фракций, проведенного методом

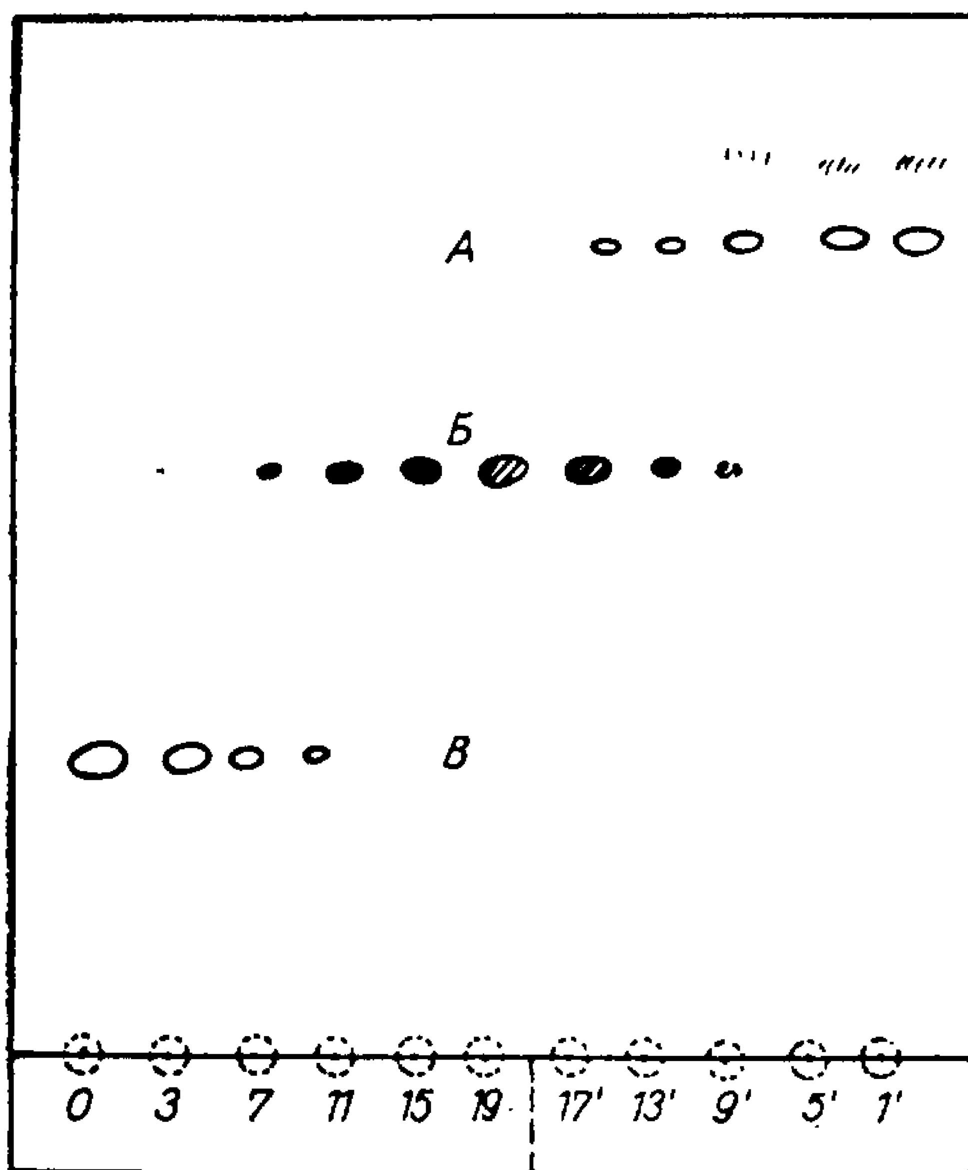


Рис. 11.15. Анализ фракций методом ТСХ, полученных противоточным распределением продуктов биологического гидроксилирования дегидроэпиандростерона [12, 13].

Адсорбент — силикагель; элюент — смесь хлороформ — метанол (95 : 5); обнаруживающий реагент — насыщенный раствор хлорида сурьмы(III) в хлороформе (100 °С). *А* — исходное соединение; *Б* — целевой продукт гидроксилирования; *В* — побочный продукт гидроксилирования (глюкозид); цифры — номера пробирок; 17', 13', 9', 5', 1' — собранные фракции.

ТСХ, фракции 1'—8', содержащие преимущественно исходное соединение, были объединены. Фракции 9'—20' и 7—20, содержащие главным образом целевое вещество (продукт гидроксилирования), также были объединены. Общая масса сухого остатка равнялась 0,7 г. Другие фракции (пробирки 0—6) содержали побочный продукт реакции — глюкозид дегидроэпиандростерона (0,10 г).

В ходе эксперимента было израсходовано немногим более 400 мл верхней фазы и около 200 мл нижней. Поскольку эмульсия в ходе разделения не образовывалась, вся процедура заняла лишь около 3—4 ч. Если бы смесь хроматографировали методом классической жидкостной хроматографии, т. е. на 30-кратном количестве силикагеля (~100 г), операция потребовала бы

существенно больше времени и расход растворителей был бы значительно больше. Кроме того, целевой продукт может частично изомеризоваться на сорбенте, и в этом случае сорбент пришлось бы или регенерировать, или выбросить. Разделение на препаративных тонкослойных пластинках длится еще дольше и стоит еще дороже. Очевидно, что метод противоточного распределения экономически был бы еще более выгоден при наличии аппарата с большим числом пробирок и большего количества разделяемой смеси. Увеличивая число переносов, можно не только обогатить смесь целевым соединением в большей степени, но и получить это соединение в чистом виде.

На рис. 11.10 схематически представлен подобный процесс, применяемый для разделения большего числа веществ с разными значениями D_m в аппарате с 24 элементами.

11.8.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТОГО [2-О-МЕТИЛТИРОЗИЛ]ОКСИТОЦИНА (МЕТИЛОКСИТОЦИН ФИРМЫ SPOFA) С ПОМОЩЬЮ ПОЛНОСТЬЮ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО АППАРАТА ДЛЯ ПРОТИВОТОЧНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ [10]

Аппарат, на котором проводилось выделение, выпускает фирма Quickfit Steady State Countercurrent Distribution Machine. В нем имеется 100 пробирок емкостью по 50 мл, помещенных в термостатируемый (интервал температур 20—25 °С, точность термостатирования ±1 °С), защищенный от попадания пыли бокс. Пробирки сконструированы так, что перемещать можно любую фазу. Аппарат также позволяет автоматически добавлять фазы из специальных емкостей. Операции проводятся автоматически, и процесс можно программировать, т. е. задавать последовательность перемещения фаз, число качаний, длительность отстаивания систем и т. д.

В качестве растворителей были выбраны взаимно насыщенные 0,05%-ная уксусная кислота и *втор*-бутанол.

Верхний резервуар заполнялся 6 л верхней или нижней фазы (обычно той фазой, которой было использовано больше). Аппарат устанавливали в положение «Заполнить» и программировали 250 переносов верхней фазы, после чего переводили переключатель в положение «Слить» при длительности качания 2 мин. После проведения еще 20 переносов верхней фазы аппарат переключали в положение «Слить», после 20 переносов нижней фазы проводилось еще 250 переносов в положении переключателя «Заполнить». После этого аппарат промывался одной из фаз и освобождался от жидкости. Верхний резервуар, в котором к этому времени уже не оставалось растворителя, вновь заполнялся 6—8 л верхней фазы, а нижний резервуар в это же время заполнялся 4—6 л тяжелой фазы. По мере необходимости

оба резервуара вновь заполнялись в ходе разделения. Переключатель аппарата устанавливали в положение «Заполнить» и проводили 110 переносов нижней фазы; после этого переводили переключатель в положение «Слить» и проводили 20 переносов

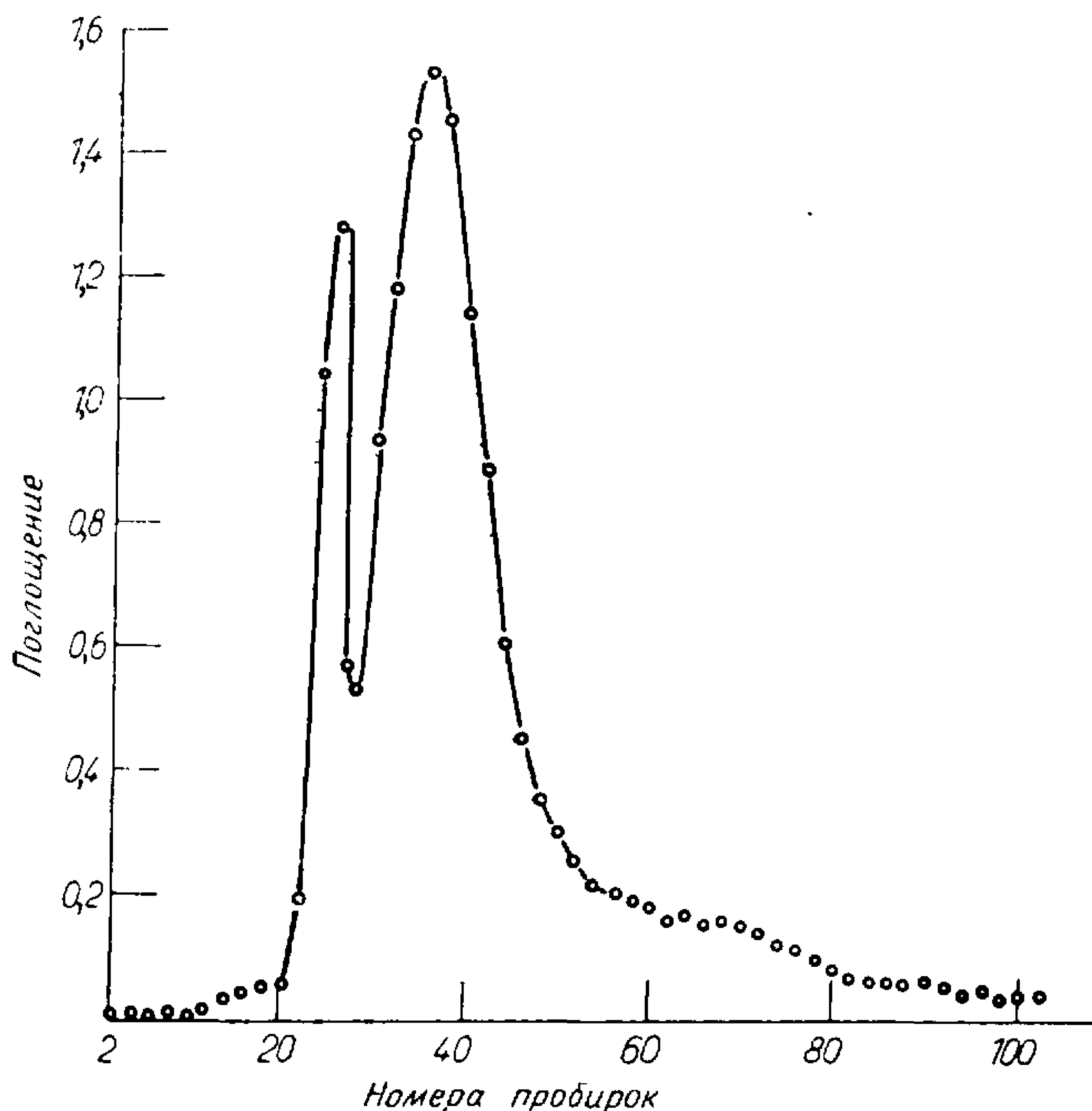


Рис. 11.16. Экспериментальная кривая распределения неочищенного метилокситоцина (SPOFA) в системе 0,05%-ная уксусная кислота — *втор*-бутанол после 110 переносов верхней фазы [10].

Разделение проводилось в аппарате для противоточного распределения «Quickfit», поглощение определялось после обработки реагентом Фолина — Чикальтау; более высокий пик — метилокситоцин.

верхней фазы. Таким способом аппарат заполняли и подготавливали к работе.

Сырой [2-О-метилтирозил]окситоцин (метилокситоцин производства SPOFA), полученный восстановлением 1,40 г защищенного пептида, растворяли в 5 мл нижней фазы и отфильтровывали. Колбу и воронку промывали 50 мл верхней фазы. Из второй и третьей пробирки аппарата шприцем отсасывали жидкость, затем заполняли нижней и верхней фазами разделяющей смеси (по 25 мл каждой) и задавали программу: разделение фаз (5 мин), встряхивание (0,5 мин), переключение в положение «Слить», 10—20 переносов верхней фазы (после 10 переносов длительность разделения фаз можно сократить до 3 мин). После выполнения 110 переносов верхней фазы (рис. 11.16) со-

отношение переносов верхней и нижней фаз меняли до 2 : 1 и при таком соотношении проводили еще 480 переносов (т. е. на каждые 2 переноса верхней фазы приходился один перенос нижней). Всего было проведено 590 переносов, из них 430 переносов верхней фазы и 160 — нижней. После этого аппарат выключали, определяли содержание [2-О-метилтирозил]окситоцина в пробирках. По результатам анализа строилась кривая изменения концентрации определяемого соединения. С помощью этой кривой были выявлены пробирки, содержащие чистое вещество. Если полученная кривая имела правильную форму, фракции, содержащие более 5% вещества (по отношению к содержанию вещества в пробирке с максимальной концентрацией), объединялись. Выход составил 200—250 мг, т. е. 24—30%. С помощью этой кривой можно также рассчитать D_m по уравнению

$$D_m = (r_{max} + 160)/(470 - r_{max})$$

и из него рассчитать теоретическую кривую.

Описанным методом очищают метилокситоцин-SPOFA в промышленном масштабе.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Barry G. T., Sato Y., Craig L. C.*, J. Biol. Chem., **174**, 209 (1948).
2. *Craig L. C.*, J. Biol. Chem., **155**, 519 (1944).
3. *Craig L. C.*, in Comprehensive Biochemistry (Florkin M., Stotz E. H., Eds.), Vol. 4, Elsevier, Amsterdam (1962), p. 1.
4. *Craig L. C.*, Anal. Chem., **22**, 1346 (1950).
5. *Hecker E.*, Chem.-Ing-Techn., **25**, 505 (1953).
6. *Hecker E.*, Verteilungsverfahren im Laboratorium, Verlag Chemie, Weinheim (1955).
7. *Hecker E.*, Naturwissenschaften, **50**, 165, 290 (1963).
8. *Hill R. J.*, in Methods in Enzymology (Colowick S. P., Kaplan N. O., Eds.), Vol. XI, Academic Press, New York, 1967, p. 378.
9. *Huber J. F. K., Meijers C. A. M., Hulsman J. A. R.*, Anal. Chem., **44**, 111 (1972).
10. *Jošt K.*, personal communication.
11. *Keil B.* (Ed.), in: «Laboratorni technika organické chemie», Nakladatelství ČSAV, Praha (1954), p. 502.
12. *Nguyen Gia Chan*, Thesis, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague (1971).
13. *Nguyen Gia Chan, Prochazka Z.*, Biologia Plantarum, **14**, 364 (1972).
14. *O'Keeffe A. E., Danver M. A., Stiller E. T.*, J. Am. Chem. Soc., **71**, 2452 (1949).
15. *Ritschard W. J.*, Chem.-Ing.-Techn., **35**, 647 (1963).
16. *Rometsch R.*, Helv. Chim. Acta, **33**, 184 (1950).
17. *Scheibel E. G.*, Chem. Eng. Progr., **44**, 681, 771 (1948).
18. *Signer R.*, Chimia, **6**, 243 (1952).
19. *Von Tavel P.*, Chimia, 23, 57 (1969).
20. *Von Tavel P.*, Chimia, **26**, 187 (1972).
21. *Von Tavel P., Signer R.*, in Advances in Protein Chemistry, Vol. XI, Academic Press, New York (1956), p. 237.
22. *Watanabe S., Morikawa K.*, J. Soc. Chem. Ind. Japan, **36**, 585 (1933).

Глава 12. Электромиграционные методы

З. ПРУСИК

Институт органической химии и биохимии
Чехословацкой академии наук, Прага

12.1. ВВЕДЕНИЕ

Электромиграционные процессы разделения основаны на различных способах использования основного свойства ионизованных частиц в жидкой среде — электрофоретической подвижности в постоянном электрическом поле.

Наиболее старый вид электрофореза — метод подвижной границы — применялся для характеристики биополимеров, в частности белков. Классический метод Тизелиуса дает достаточно точную информацию об электрофоретической подвижности макромолекул, но невысокое разрешение. Кроме того, этим методом не удается выделять чистые компоненты анализируемой смеси, за исключением самого быстрого и самого медленного. Если подвижность компонентов уменьшается в последовательности A, B, C, D, то за появляющейся спустя некоторое время зоной чистого компонента A следуют зоны смесей A+B, A+B+C, A+B+C+D, B+C+D, C+D и в заключение зона чистого компонента D. Разработка зонного электрофореза представляла собой существенный шаг вперед. При разделении методом зонного электрофореза отдельные компоненты смеси также перемещаются с различными скоростями в среде электролита постоянного состава, однако перемещение компонентов в этом случае продолжается до полного их разделения, т. е. компоненты располагаются в последовательности A, B, C, D, E. В настоящее время разработаны многочисленные модификации зонного электрофореза, а также методы, объединяющие зонный электрофорез и другие аналитические методы. Диффузию можно ограничить с помощью способов, перечисленных в табл. 12.1.

При проведении разного рода разделений очень важно, чтобы у полученных зон были четкие границы. Первым методом

Таблица 12.1

Обзор методов антиконвекционной стабилизации зон

Среда	Метод стабилизации
Жидкая	При помощи: а) градиента плотности [97] б) вращения [41], камера с извилистыми каналами [53] в) капиллярного эффекта, ламинарного потока г) нулевого гравитационного эффекта ($g=0$, сателлит) д) возрастающей вязкости (с полимерным неэлектролитом)
Пористая	Применение различных типов носителей а) волокнистых (бумаги, ионообменной бумаги, полихлорвиниловой бумаги, бумаги из стекловолокна) б) гомогенных пленок (ацетат- и нитроцеллюлозы) в) незакрепленных слоев, обладающих молекулярно-ситовыми свойствами (целлюлоза, крахмал, певикон[а], стекло, полиамид) г) незакрепленных слоев, обладающих молекулярно-ситовыми свойствами (гранулированные гели, в том числе сефадекс[б], агароза, биогель[б], полиакриламид, силикагель)
Гель	Применение различных типов гелей а) крахмального блочного б) полиакриламидного в) агарозного блочного

[а]Сополимер поливинилацетата и поливинилхлорида.
[б]См. гл. 6.

фокусирования явилось изоэлектрическое фокусирование, применяемое при разделении высокомолекулярных амфотерных соединений. Разделение проводят в среде, представляющей собой смесь амфотерных соединений, образующих устойчивый градиент pH в постоянном электрическом поле. Соединения с различными изоэлектрическими точками мигрируют при электрофорезе до такого положения, в котором значение pH становится равным его изоэлектрической точке. После достижения этой точки миграция соединения прекращается и его зона фокусируется. Устанавливается квазистационарное состояние, при котором диффузия компенсируется фокусирующим влиянием электрического поля в градиенте pH. В этом случае компоненты смеси A, B, C, D обычно располагаются между низкомолекулярными амфотерными соединениями M, образующими естественный градиент pH. В результате наблюдается следующее расположение зон: M_1, A, M_2, B, M_3, C, M_4, D, M_5 (где M_1—M_5 — добавленные промежуточные фракции с различными изоэлектрическими точками).

Четвертым основным методом разделения, который быстро развивается в настоящее время, является изотахофорез (ИТФ). В отличие от других методов ИТФ требует использования двух электролитов, а именно «ведущего» (leading) электролита, который содержит ион с максимальной электрофоретической подвижностью, и «замыкающего» (terminating) электролита, который содержит ион с минимальной подвижностью по сравнению с промежуточной подвижностью ионов, входящих в состав анализируемой смеси. Исходное расположение «ведущий ион — (A+B+C+D) — замыкающий ион» постепенно изменяется до состояния, аналогичного получаемому по методу с подвижной границей. Когда ионы исследуемой смеси достигают состояния «ведущий ион — A, B, C, D — замыкающий ион», разделение зон прекращается, так как электролит-носитель отсутствует. Перемещение зарядов осуществляется только в результате перемещения компонентов исследуемой смеси и любых ионов противоположного заряда. Установлено, что все компоненты движутся с одинаковой скоростью. Дискретное распределение электрического поля в зонах приводит к резко выраженным границам раздела зон. Возможность регулирования концентраций в исследуемых зонах путем изменения свойств «ведущего» электролита и равномерность концентрации данного компонента внутри каждой изучаемой зоны делают этот метод особенно ценным для качественного и количественного анализа, а также для препаративного разделения. Практические возможности применения основных электромиграционных методов приведены в табл. 12.2.

Наряду с основными методами существует ряд смешанных методов, среди которых дискретный электрофорез в полиакриламидном геле играет важную роль в разделении биополимеров. В этом методе сначала используются некоторые элементы изотахофореза, который через некоторое время заменяется на зонный электрофорез в среде геля, однако в геле могут иметь место и молекулярно-ситовые эффекты.

Возможность применения неоднородных (дискретных) систем электролитов в многофазном зонном электрофорезе используется недостаточно полно. Об этом, в частности, говорят результаты анализа расчетных систем электролитов в условиях фокусирования, ограниченного [16, 73] или неограниченного во времени.

Только при электрофорезе с подвижной границей и при зонном электрофорезе наблюдается постоянство pH во всей среде и постоянно расходящееся движение компонентов исследуемой смеси. Изоэлектрическое фокусирование может приводить к максимальным величинам pH при нулевой результирующей подвижности разделяемых компонентов. В условиях изотахофореза

Таблица 12.2

Обзор электромиграционных методов

Основные методы

Название метода	Сокращение	Возможная область применения			
		Анализ		Препаративное разделение	
		количественный	качественный	микро	макро
Электрофорез с подвижной границей (метод Тизелиуса)	ЭПГ	+	++	—	—
Зонный электрофорез	ЗЭ	++	+	+	+
Изоэлектрическое фокусирование	ИФ	+++	+	++	+
Изотахофорез	ИТФ	+++	+++	+	++
Стационарный «стэкинг» (stacking)	ССС	+++	+++	+	++

Производные методы

Название метода	Сокращение	Характеристика метода (принципы разделения) [a]
Дискретный электрофорез	ПАГЭ в МБС	Последовательно ЭПГ, ИТФ, ЗЭ, МС
Многофазный зонный электрофорез	МЗЭ	
Электрофорез в градиенте плотности полиакриламидного геля (электрофорез, определяемый размером пор)	П-Г-Э	ЗЭ и в заключение МС
Электрохроматография, метод отпечатков пальцев		а) ЗЭ и ИОХ в перпендикулярном направлении б) ИОХ и в перпендикулярном направлении ЗЭ
Иммуноэлектрофорез		ЗЭ, МС, иммунопреципитация в первом направлении: любой тип разделения; перпендикулярное направление ЗЭ и иммуноосаждение
Магнитоэлектрофорез		ЗЭ, одновременно влияние магнитного поля

[a] Принятые сокращения: БЭ — метод Тизелиуса с подвижной границей, МБС — многофазная буферная система, МС — молекулярно-ситовое разделение, ПАГЭ — электрофорез в полиакриламидном геле.

каждая зона характеризуется собственным значением pH, которое определяется действительным составом зоны. Движение отдельных компонентов в системе изотахофореза является различным до тех пор, пока компоненты не расположатся в соответствии с их подвижностью. После этого скорости перемещения всех зон становятся равными, а pH принимают характеристические значения, соответствующие квазистационарному соотношению компонентов в отдельных зонах.

Зоны можно также сфокусировать в результате наложения молекулярно-ситового эффекта, например, если электрофорез ведется в полиакриламидном геле, то в результате влияния градиента плотности. При проведении электрофореза биополимеров все чаще используются принципы аффинности и иммунной преципитации. Контролировать ход электромиграционного разделения с высоким разрешением удобно с помощью метода двумерного электрофореза и иммунной преципитации.

12.2. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

12.2.1. ТЕОРИЯ МИГРАЦИИ ИОНОВ В УСЛОВИЯХ ЗОННОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И ЭЛЕКТРОФОРЕЗА С ПОДВИЖНОЙ ГРАНИЦЕЙ

Оба рассматриваемых в этом разделе типа электрофореза имеют общую основу. Ионы, коллоидные частицы и частицы большего диаметра подвергаются действию постоянного однородного электрического поля с напряженностью E (В/см). Среда, окружающая эти заряженные частицы, также однородна по составу и характеризуется одной и той же величиной pH. Заряженные частицы движутся в электрическом поле по направлению к противоположно заряженному электроду. В этом случае скорость идеализированной сферической частицы определяется формулой

$$v = zE/6\pi\eta_r, \qquad (12.1)$$

где z — заряд частицы, E — напряженность электрического поля, η — вязкость среды, а r — радиус частицы. Сопротивление движению частицы пропорционально вязкости среды η и радиусу частицы r. Электрофоретическая подвижность u определяется как скорость движения частицы, деленная на напряженность электрического поля,

$$u = v/E \qquad (12.2)$$

Величину E в уравнении (12.2) можно выразить через измеряемые величины

$$E = j/q\varkappa, \qquad (12.3)$$

где q — площадь сечения электрофоретической ячейки, $\varkappa$ — электропроводность и j — плотность тока (собственно это одно из выражений закона Ома). Скорость v равна расстоянию S, проходимому частицей в единицу времени:

$$s = vt \tag{12.4}$$

Используя уравнение (12.2), подвижность u можно представить следующим выражением:

$$u = sq\varkappa/tj \tag{12.5}$$

Скорость v определяется соотношением

$$v = uj/q\varkappa \tag{12.6}$$

Эти уравнения справедливы во всех случаях, однако следует иметь в виду, что уравнения (12.1) и (12.2) предполагают бесконечное разбавление и отсутствие солей. Влияние электролита выражается с помощью ионной силы μ, которую можно представить как

$$\mu = (1/2) \sum_i c_i z_i^2, \tag{12.7}$$

где c_i — концентрация, а z_i — заряд ионов, присутствующих в растворе. С повышением ионной силы подвижность снижается из-за накапливания ионов противоположного знака вокруг частицы, приводящему к снижению ее эффективного заряда. Небольшие изменения в ионной силе изменяют подвижность примерно в соответствии с соотношением:

$$u_1 \approx u_2 (\mu_2^{1/2}/\mu_1^{1/2}) \tag{12.8}$$

Согласно уравнению (12.1), электрофоретическая подвижность обратно пропорциональна вязкости среды. Вязкость уменьшается с увеличением температуры, и поэтому подвижность увеличивается примерно на 2,7% с повышением температуры на каждый градус. Подвижность частиц также может снижаться под влиянием носителя, который может быть гелем, может иметь волокнистую или порошкообразную структуру, может быть насыщен электролитом. В таких случаях путь частицы фактически удлиняется и одновременно уменьшается напряженность электрического поля. Гелеобразные носители могут проявлять молекулярно-ситовые свойства, что приводит к замедлению движения или даже к полной остановке частиц с большим стоксовым радиусом. Эти эффекты нашли широкое практическое применение в зонном электрофорезе. На ход разделения оказывают влияние и сорбционные процессы.

Когда через электрофоретическую ячейку проходит ток, выделяется джоулево тепло N. Количество выделившегося тепла определяется уравнением

$$N=RI^2 \quad \text{или} \quad N=U^2/R=UI\ (\text{Вт}), \qquad (12.9)$$

где U — напряжение, В; I — сила тока, А; R — сопротивление, Ом. Чтобы вязкость системы, а следовательно, и подвижность были постоянными, выделяющееся тепло необходимо эффективно отводить, иначе из-за термической конвекции возникает опасность смешения зон. Подавление термической конвекции особенно важно в тех случаях, когда электрофорез проводится в отсутствие носителя.

12.2.2. НЕПРЕРЫВНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В СВОБОДНОМ ПОТОКЕ

В основу этого метода положен зонный электрофорез в электролите, который движется перпендикулярно направлению электрического поля. Первоначальный вариант метода предназначен для разделения на бумаге. Позднее [2] он был применен в отсутствие носителя, при этом стабилизация зон осуществлялась ламинарным потоком достаточно тонкого слоя электролита. Электрофоретическая ячейка имела форму плоской квадратной или прямоугольной рамки, длина ее стороны составляла несколько десятков сантиметров, а толщина слоя равнялась 0,25—0,60 мм. Вначале этот прибор использовался для разделения высоко- и низкомолекулярных пептидных соединений, но позднее выяснилось, что таким способом можно эффективно разделять не только растворимые электрофоретические соединения, но и коллоидные частицы, включая субклеточные частицы и клетки, если конструкция аппарата не допускает быстрого осаждения макрочастиц на стенках электрофоретической ячейки. Движение частиц в условиях непрерывного электрофореза описывается следующим простым соотношением [39]:

$$\operatorname{tg}\alpha = \text{Электрофоретическая подвижность/Скорость электролита-носителя}, \qquad (12.10)$$

где α — угол между направлениями движения зоны и электролита-носителя (рис. 12.1). Для того чтобы сохранять величину α постоянной, необходимо поддерживать постоянство условий разделения в течение длительного времени. По этой причине подаваемое напряжение или ток должны быть стабилизованы, аппарат должен быть снабжен эффективной системой охлаждения и терморегулировки, точными насосами для подачи образца и электролита-носителя при горизонтальном положении камеры

или многоканальным перистальтическим насосом для отбора фракций на выходе из электрофоретической ячейки для прибора с вертикальным положением камеры.

Производительность приборов обычно лежит в пределах от 100 до 200 мг образца в час. Разделение осаждающихся частиц

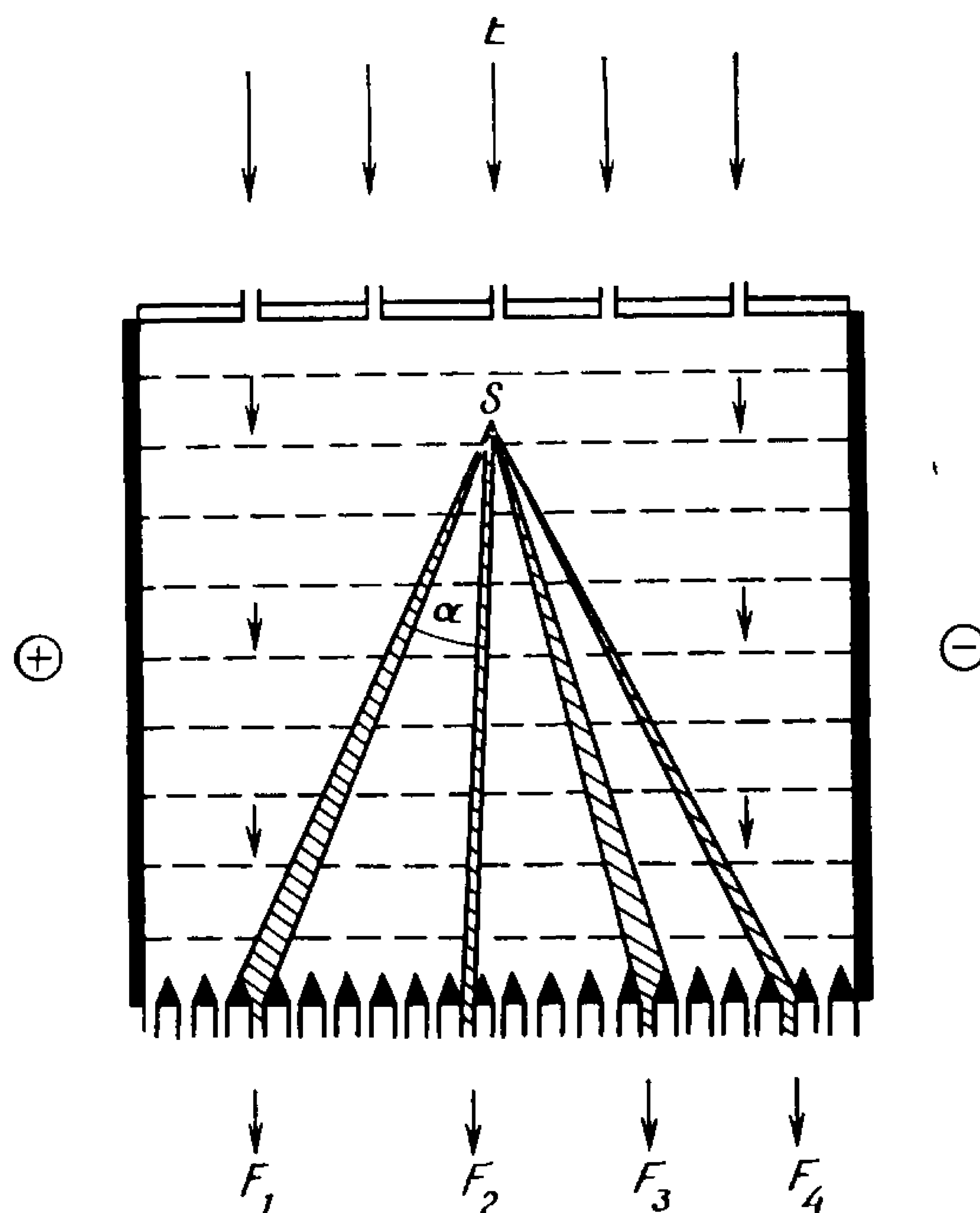


Рис. 12.1. Схема камеры аппарата для непрерывного электрофореза в свободном потоке (вид сверху) [38].

E — Электролит-носитель (подается насосом сверху, а образец вводится снизу); *S* — исследуемая смесь (заряженные компоненты смеси в соответствии с зарядом и электрофоретической подвижностью мигрируют в электрическом поле влево или вправо, а незаряженные компоненты вымываются строго вертикально); α — угол отклонения отрицательно заряженных компонентов; F_1—F_4 — места выведения компонентов смеси.

ведется в специальных приборах с вертикальной камерой, а разделение растворимых соединений — в приборах с горизонтальной камерой.

Преимущества данного прибора — его высокая эффективность, воспроизводимость результатов и высокая чистота получаемых препаратов. На рис. 12.2 показан прибор этого типа с горизонтальной камерой [79], а на рис. 12.3 приведен пример разделения компонентов нуклеиновых кислот методом электрофореза в свободном потоке.

Таблица 12.3

Рекомендуемые системы электролитов для непрерывного зонного электрофореза в свободном потоке

pH	Электролит-носитель для электрофоретической камеры	Электролит для электродных камер	Разделяемые соединения или тип соединения
2,0	0,187 М уксусная кислота 0,187 М муравьиная кислота	32 мл ледяной уксусной кислоты, 21,3 мл 99%-ной муравьиной кислоты, вода до 1 л	Нуклеозиды, нуклеотиды [66]
2,6	0,5 М уксусная кислота	1 М уксусная кислота	Мукополисахариды, белки, полисахариды, основные белки, основные и нейтральные пептиды [65]
3,0	Фенол — уксусная кислота — вода (1 : 1 : 1, г/мл/мл)	Как и в электрофоретической камере или уксусная кислота — вода (1 : 1, по объему)	Растительные экстракты [7]
3,9	2,58 мл пиридина, 8,58 мл уксусной кислоты, вода до 1 л	7,73 мл пиридина, 25,75 мл уксусной кислоты, вода до 1 л	Гидролизаты белков [35]
4,9	3,7 мл пиридина, 2,96 мл уксусной кислоты, вода до 1 л	11,1 мл пиридина, 3,4 мл уксусной кислоты, вода до 1 л	Экстракт тимуса, пептиды [40]
5,1	0,025 М ацетат аммония, уксусная кислота	0,075 М ацетат аммония, уксусная кислота	Ферменты, цереброзидсульфатаза [67]
5,3	0,025 М ацетат натрия, уксусная кислота до pH 5,3	0,75 М ацетат натрия, доведенный до pH 5,3 0,75 М уксусной кислотой	Фаги [8]
5,6	0,08 М пиридин, уксусная кислота	0,24 М пиридин, уксусная кислота	Нейрогипофизарные экстракты, вазопрессин, окситоцин, AVTH [81]
7,2	0,01 М трис-буфер, 0,01 М ацетат магния, лимонная кислота до pH 7,2	0,05 М трис-буфер, 0,05 М ацетат магния, лимонная кислота до pH 7,2	Рибосомы из *E. coli* [66]
7,3	0,01 М фосфат калия-натрия	0,03 М фосфат калия-натрия	Фактор роста [88]
7,4	0,01 М триэтаноламин, 0,01 М уксусная кислота, 0,001 М ЭДТА, 0,33 М сахароза, 2 М NaOH до pH 7,4	0,1 М триэтаноламин, 0,1 М уксусная кислота, 2 М NaOH до pH 7,4	Лизосомы, митохондрии из митохондриальных мембран [38]
8,5	0,15 М трис-буфер, 4,0 М мочевина, доведенная до pH 8,5 лимонной кислотой	0,45 М трис-буфер, лимонная кислота до pH 8,5	Комплекс РНК — белок, кислотные белки [89]
8,6	0,08 М трис-буфер, лимонная кислота	0,24 М трис-буфер, лимонная кислота	Сывороточные белки [26]
10,5	0,017 М глицин, NaOH, NaCl до электропроводности $\varkappa=1{,}5\cdot10^{-3}$	3,8 г глицина в 1 л, 0,5 М NaOH до pH 10,5, 2 М NaCl до электропроводности $\varkappa=5\cdot10^{-3}$	Белки вируса табачной мозаики [87]

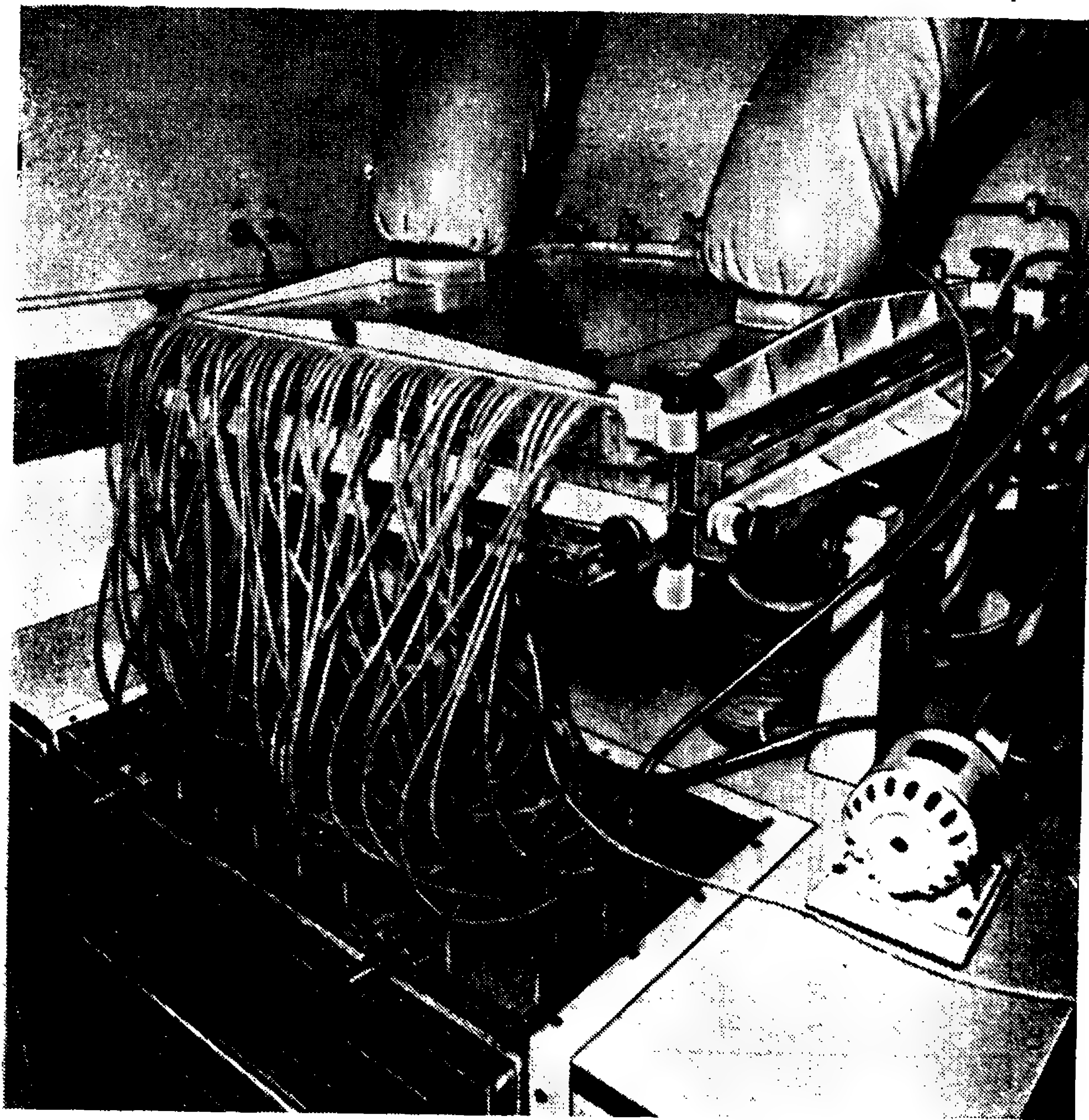


Рис. 12.2. Прибор для непрерывного зонного электрофореза в свободном потоке с горизонтальной щелью [79].

Термостатируемая камера с верхним и нижним входом для охлаждающего воздуха; спереди видны капиллярные трубки для сбора образцов из 48 ячеек, внизу — охлаждаемый сборник фракций, в центре — детектор высоты уровня в ячейках для сбора фракций; под детектором справа — охлаждаемый ввод для электродного буферного раствора; внизу справа — мотор насоса для подачи образца.

В табл. 12.3 приведен рекомендуемый состав электродного электролита и электролита-носителя для разделения растворимых веществ и быстро осаждающихся частиц. Электропроводность электролита-носителя в электрофоретической ячейке обычно лежит в пределах $1 \cdot 10^{-3}$—$2{,}2 \cdot 10^{-3}$ Ом$^{-1}$·см$^{-1}$, только система фенол — уксусная кислота — вода имеет существенно (на порядок) более низкую электропроводность. Метод непрерывного электрофореза чаще всего используется для разделения био-

логических экстрактов, пептидов и белков и в последнее время для разделения клеток и субклеточных частиц (однако выбрать электролит в этом случае сложнее, так как необходимо поддерживать оптимальные условия для выживания клеток). Осмотическое давление регулируется путем добавления сахарозы; в некоторых случаях, например при выделении клеток крови, саха-

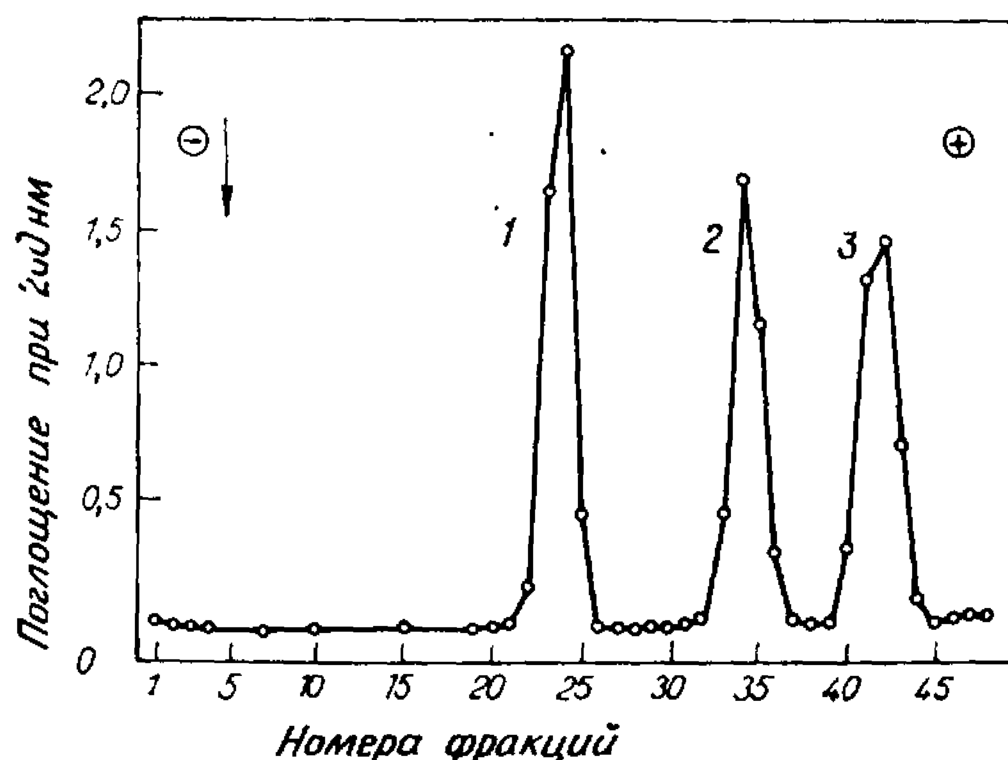


Рис. 12.3. Разделение АТФ, АДФ и АМФ методом непрерывного электрофореза с горизонтальным положением камеры [92].

Напряжение 1400 В; сила тока 155 мА; буферный раствор ацетата аммония, pH 5,0; скорость потока электролита-носителя 50 мл/ч; скорость подачи образца 0,5 мл/ч при концентрации 35 ед/мл.
1 — аденозинмонофосфат; 2 — аденозиндифосфат; 3 — аденозинтрифосфат.

розу можно заменить на глюкозу. См. также работу Зайлера и сотр. [111].

Подробный обзор возможных областей применения метода опубликован Ханнигом [38]. В большинстве случаев в условиях непрерывного электрофореза в свободном потоке градиент потенциала составляет 30 и 50 В/см.

12.2.3. ЗОННЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА БУМАГЕ

Широкое распространение метода бумажного электрофореза обусловлено такими свойствами бумаги, как механическая прочность, способность удерживать большое количество электролита и образца, возможность придания требуемой формы, легкость применения двухмерных методов и простота элюирования образца. Обнаружение проводится или погружением в раствор реагента или опрыскиванием этим раствором. Электрофореграмму после высушивания можно хранить. Однако бумага имеет и ряд недостатков: это неоднородность бумаги вдоль листа, пористость, которая удлиняет путь перемещения вещества. В ре-

зультате сорбции увеличиваются потери в процессе препаративного разделения или разделение вообще становится практически невозможным из-за образования «хвостов» (глико- и липопротеины). Расширение зон вследствие диффузии можно умень-

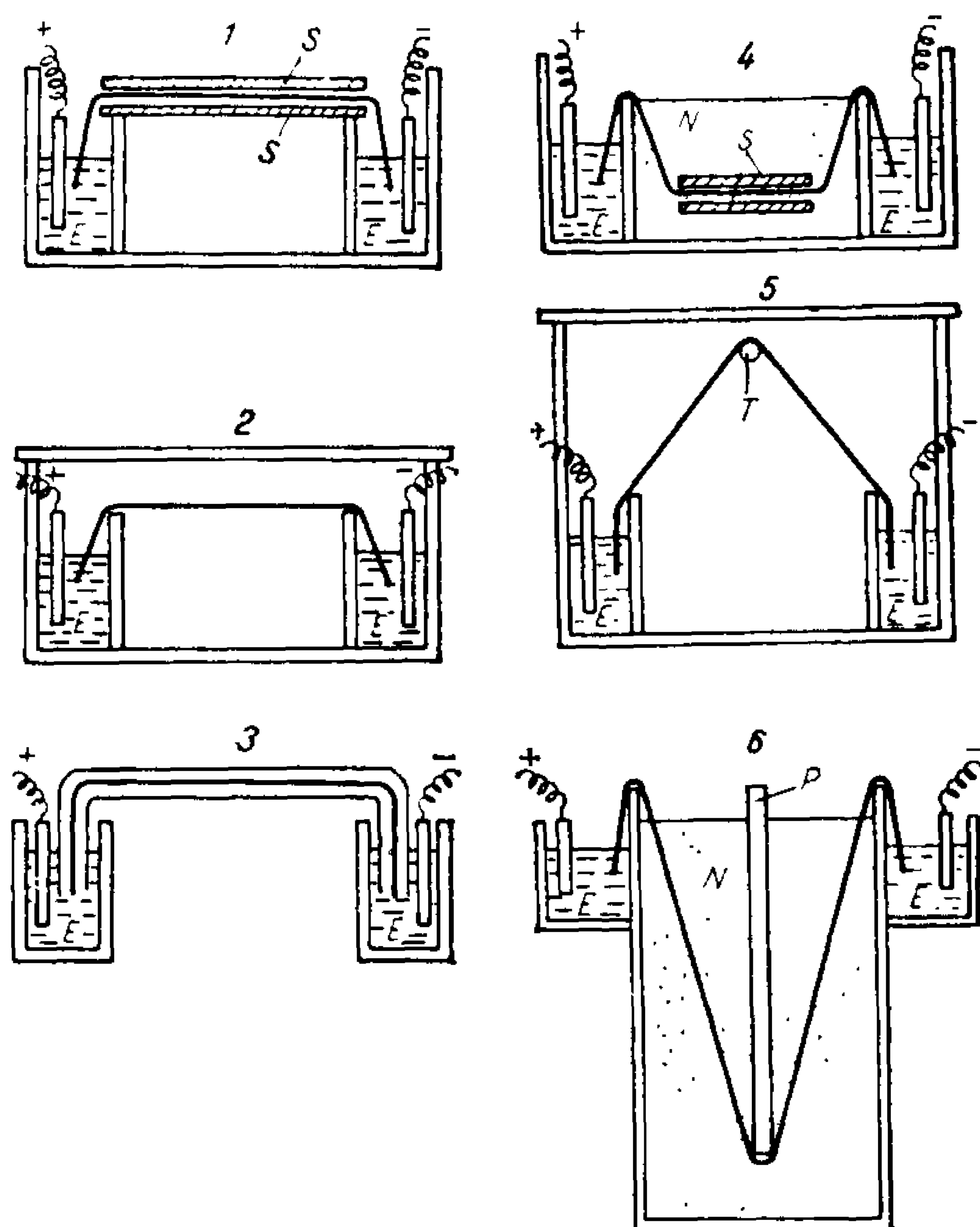


Рис. 12.4. Схемы приборов для низковольтного зонного электрофореза.

E — электродные камеры; *N* — инертная жидкость; *P* — стеклянная перегородка, растягивающая бумагу; *T* — стеклянный стержень.

1 — прибор с горизонтальной камерой, в котором бумага располагается между стеклянными пластинами (*S*); *2* — прибор обычного типа [33], пригодный для горизонтального электрофореза белков (разработано много модифицированных его вариантов); *3* — прибор с горизонтальной камерой для разделения белков; у этого прибора небольшой объем влажной камеры и насыщение парами электролита происходит быстро; *4* — аппарат Кремера и Тизелиуса [14], в котором отвод тепла осуществляется с помощью инертной жидкости; *5* — аппарат с подвешенной в центре бумагой, часто используется (в виде различных модификаций) для рутинного анализа белков и низкомолекулярных соединений [62, 108]; *6* — прибор, в котором избыточное тепло быстро удаляется инертной жидкостью, например CCl_4; пригоден для разделения низкомолекулярных соединений при градиенте напряжения 20—35 В/см [63].

шить, сокращая длительность разделения, снижая температуру и одновременно увеличивая градиент напряжения. Для разделения высокомолекулярных соединений пригодна простая аппаратура и достаточен низкий градиент напряжения, но для разделения низкомолекулярных соединений необходим градиент напряжения до 200 В/см. Примеры более простых приборов приведены на рис. 12.4. Приборы с эффективным охлаждением позволяют более точно определять электрофоретическую по-

движность. Согласно Оффорду [72], молекулярную массу или заряд вещества можно оценить, если известна относительная (по сравнению со стандартом) его подвижность u_{rel}:

$$u_{rel} = k\,(z/M^{2/3}), \qquad (12.11)$$

Уравнение (12.11) является особенно ценным, если исследуются заряды и молекулярные массы олигопептидов.

Приборы для высоковольтного электрофореза снабжаются устройством для отвода джоулева тепла. Чаще всего используется система постоянного теплоотвода [34, 107]. Прибор с жидкостным теплообменником проще по конструкции (правда, отвод тепла в нем менее эффективен) и позволяет получить очень однородную миграцию зон. Для отвода тепла используются такие инертные жидкости, как толуол, высшие фракции нефти, например с т. кип. 145—200 °С или фторированные углеводороды. Пропитанную буферным раствором бумагу помещают в жидкость, которую можно охлаждать с помощью погруженного в нее холодильника.

В лаборатории авторов главы успешно используется нисходящий бумажный электрофорез без охлаждения, разработанный Микешом [70]. Принципиальная схема прибора для такого разделения показана на рис. 12.5. Этот прибор используется в основном для аналитического и препаративного разделения пептидов, содержащихся в ферментативных гидролизатах белков. Оптимальное разделение достигается при применении таких буферных растворов, электропроводность которых соответствует 1/150 М фосфатному буферному раствору Соренсена (3,63 г KH_2PO_4 + 14,32 г $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ в 10 л воды, рН 7). Летучие буферные растворы более удобны, если во время их испарения концентрация ионов на бумаге не увеличивается. Например, для разделения пептидов обычно используется пиридин-ацетатный буферный раствор, рН 5,6 (4 мл пиридина + 1 мл уксусной кислоты, вода до 1 л). Нейтральные, незаряженные, соединения остаются в центре бумаги, т. е. на старте, и образуют узкую смешанную зону. В верхней части бумаги располагаются зоны пептидов основного характера, а в нижней части — кислотного.

Наряду с компенсацией нисходящего движения буфера направленным в противоположном направлении электроосмосом, выпаривание влияет главным образом на перемещение буферного раствора из электродных камер по направлению к центру бумаги. Это движение электролита, противоположное направлению движения зон, сказывается на фокусировании зон.

На листе ватмана можно одновременно анализировать до 20 образцов. При препаративном разделении на лист ватмана № 1 можно нанести до 50 мг смеси пептидов в виде узкой зоны, а на листе более толстого ватмана № 3 можно разделить до

250 мг смеси. Анализируемые образцы, не содержащие солей, наносят на сухую бумагу и после высушивания помещают в кюветы для электродов. Опрыскивание бумаги буферным раствором следует начинать с краев, расположенных ближе к электродам, и продолжать по направлению к центру, где расположены образцы, до тех пор, пока оттенок бумаги не станет таким же,

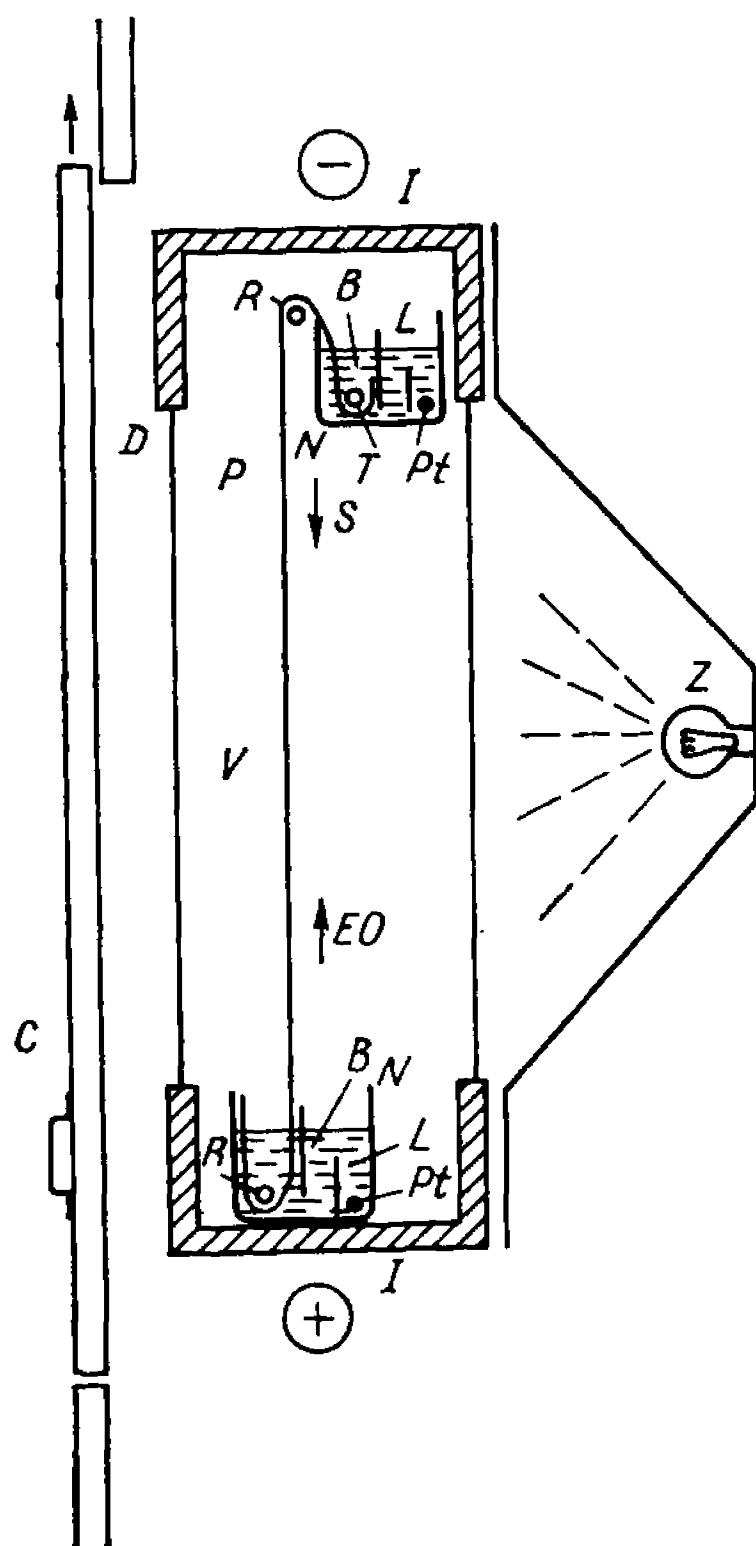


Рис. 12.5. Схема прибора для нисходящего бумажного электрофореза [70].

N — Камера из поливинилхлорида с системой отсеков (*L*) и платиновым электродом (Pt); *B* — заполняющий камеру буферный раствор; *P* — бумага; *R* — стеклянный стержень, удерживающий бумагу в вертикальном положении; *S* — направление стекания буферного раствора; *EO* — направление компенсирующего перемещения образца под действием электроосмоса; *V* — образец (его наносят в центр сухой бумаги, которую помещают в кювету и опрыскивают буферным раствором *B* и сразу же включают ток); *I* — изолирующая камера со стеклянными передними стенками и герметичными дверцами *D* (в процессе работы камера запотевает внутри); *C* — заземляющая проволочная сетка, которая автоматически отключает ток; *Z* — источник света, облегчающий равномерное опрыскивание.

как у участков бумаги, близких к погруженным непосредственно в кюветы. Максимальное напряжение составляет 1500 В, а длительность анализа обычно не превышает 90 мин. Этот прибор пригоден также для двухмерного разделения комбинированным методом, сочетающим электрофорез и хроматографию, применяемым для получения пептидных карт. Оборудование для проведения электрофореза этого типа производится венгерской фирмой Labor MIM (Будапешт).

Приборы для высоковольтного электрофореза с постоянным теплообменом, согласно данным работы [80], можно с успехом использовать в течение длительного времени. Новый получив-

ший широкое распространение прибор с металлическим односторонним теплообменником имеет, по данным Прусика и Штепанека [82] (см. разд. 12.7.2), более эффективную систему охлаждения и его можно применять при градиенте напряжения до 170 В/см. Такие приборы выпускает фирма CAMAG (Швейцария).

12.2.4. ЗОННЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АЦЕТАТЦЕЛЛЮЛОЗНОЙ МЕМБРАНЕ

Для зонного электрофореза ацетатцеллюлозную мембрану (САМ) первым использовал Кон [51]. По мнению Кона, преимущества этого носителя — его однородность и строго определенная пористость. САМ содержит пренебрежимо малое число ОН-групп, загрязненность органическими и неорганическими примесями также весьма мала. В тех случаях, когда сильная сорбция может приводить к образованию на бумаге полосок сзади зон (как, например, при электрофорезе биополимеров) важным преимуществом становится пониженная сорбционная активность САМ. В отличие от бумаги САМ позволяет получить хорошее разделение α_1-фракции сывороточного альбумина, а также инсулина, фибриногена, гистонов, лизоцимов, глико- и липопротеинов и нуклеиновых кислот. После электрофореза меченых соединений остаточная радиоактивность между зонами и стартом исключительно мала. Обесцвечивание фона, если обнаружение проводится путем окрашивания и последующего обесцвечивания, происходит достаточно быстро.

На САМ удобно оценивать количественно содержание фракций. САМ, предназначенную для колориметрических определений, пропитывают парафиновым маслом, например Shell Whitmore Oil 120, или уксусной кислотой, при этом САМ становится прозрачной, и на ней можно измерять поглощение и отражение. Поскольку САМ растворима в ряде органических растворителей, при проведении некоторых количественных определений можно использовать это ее свойство. Полученные растворы можно анализировать, колориметрически или сцинтилляционным методом. Для иммуннодиффузии и иммуноэлектрофореза САМ можно применять даже без агара. Разделяемые на САМ соединения, как правило, дают узкие зоны, что позволяет для большинства типов разделений уменьшить общую длину пути до 6—12 см. Миграция на меньшее расстояние приводит к сокращению длительности электрофореза и меньшему уширению зон под влиянием диффузии. В результате разделение, например, сывороточных белков можно осуществить при градиенте потенциала в 20—25 В/см за 60—90 мин.

ПРИБОРЫ ДЛЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА АЦЕТАТЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ МЕМБРАНАХ

Конструкция прибора для электрофореза на мембранах из САМ может быть достаточно простой, но она должна обеспечивать тщательное насыщение (водяными парами) пространства вокруг легко высыхающей тонкой ацетатцеллюлозной мембраны. В связи с интенсивным испарением воды с САМ происходит локальное увеличение электрического сопротивления носителя, приводящее к перегреву и искажению разделенных зон, а также к разрушению носителя. По этой причине камеру изолируют от окружающей атмосферы жидкостным затвором, а открытые кю-

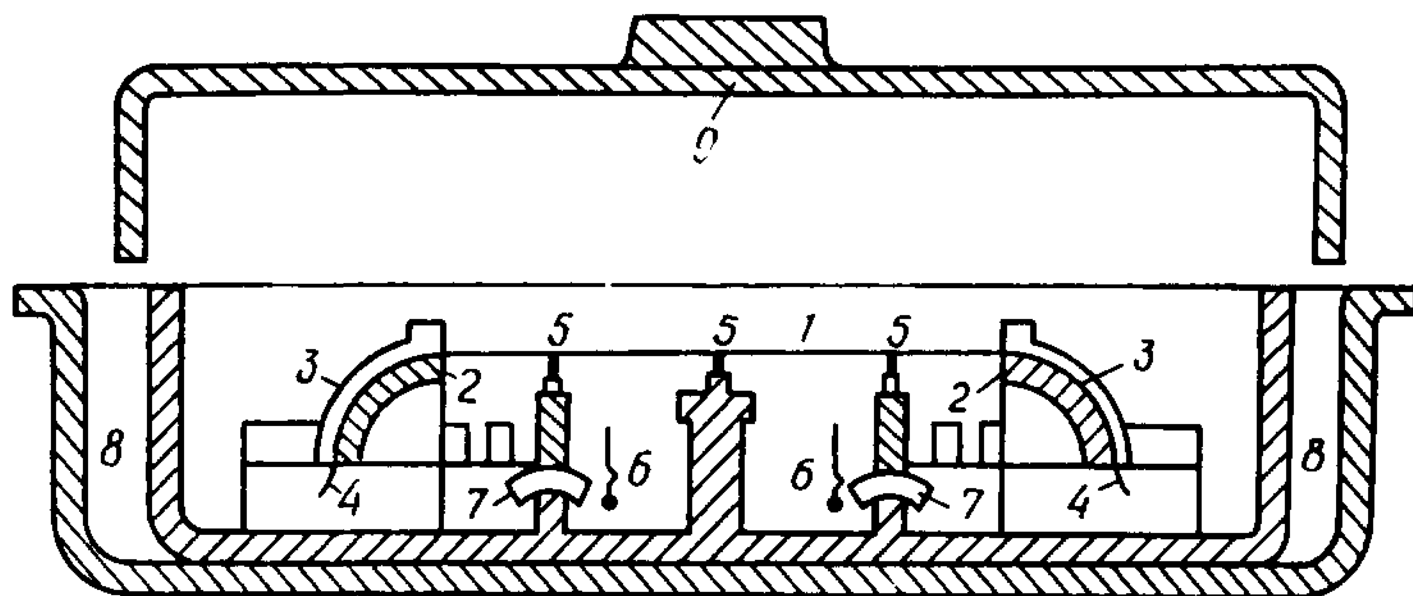


Рис. 12.6. Схема прибора для электрофореза на ацетатцеллюлозных мембранах.

1 — ацетатцеллюлозная мембрана (САМ); *2* — поддерживающий стержень для ввода тока; *3* — держатель полоски из САМ; *4* — бумажный мостик-фитиль для прохождения тока во внешнюю ячейку; *5* — регулируемая пластиковая подложка; *6* — внутренние электродные ячейки; *7* — ватные мостики-фитили ячеек; *8* — полость для водяного затвора электрофоретической камеры; *9* — крышка камеры, вставляемая в полость водяного затвора. Фирма Shandon Scientific Co., Ltd. выпускает такие приборы в термопластичном корпусе, снабженном прозрачной крышкой. Приборы аналогичного назначения выпускает также фирма Labor MIM.

веты, содержащие электролит, помещают под мембраной. На рис. 12.6 показана схема прибора этого типа, выпускаемого в Венгрии. Источник питания обеспечивает регулируемое напряжение до 200 или 400 В или регулируемый ток (предпочтительно стабилизованный). Для стандартизованного разделения, при проведении которого учитывается влияние выделяющегося тепла, удобнее всего источник питания со стабилизованным током. В соответствии с шириной полоски САМ сила тока обычно составляет 0,4—0,5 мА/см ширины. Длина полоски, как правило, не превышает 8—10 см.

Буферные растворы для электрофореза на САМ обычно имеют более низкую электропроводность, чем аналогичные растворы, применяемые для бумажного электрофореза. Для электрофореза в барбитуратном буферном растворе рекомендуется 0,05—0,07 М раствор диэтилбарбитурата. Составы буферов при-

Таблица 12.4

Буферные растворы для электрофореза на ацетатцеллюлозной мембране

Анодный раствор		Катодный раствор		Примечания
pH	состав	pH	состав	
9,1	25,2 г трис-буфера, 2,5 г ЭДТА, 1,9 г борной кислоты, вода до 1 л	8,6	5,15 г диэтилбарбитурата натрия, 0,92 г диэтилбарбитуровой кислоты, вода до 1 л	Дискретная система растворов [31], САМ пропитывают смесью (1 : 1) обоих буферов
8,6	1,84 г диэтилбарбитуровой кислоты, 10,3 г диэтилбарбитурата натрия, вода до 1 л; для предотвращения роста микроорганизмов добавляют 5 мл 5%-ного раствора тимола в изопропиловом спирте	8,6	Соответствует анодному	Рутинные анализы сыворотки [24], кинины [29]
5,3	25 мл пиридина, 10 мл ледяной уксусной кислоты, дистиллированная вода до 2 л	5,3	Соответствует анодному	Электрофорез мочи, аминокислот [52

ведены в табл. 12.4. Методы окрашивания, применяемые при разделении на САМ, аналогичны методам окрашивания на бумаге, однако нельзя использовать такие растворители (например, ацетон и хлороформ), в которых САМ набухает или растворяется. Концентрация растворов красителя может быть ниже, чем при разделении на бумаге, и предпочтение отдается водным, а не спиртовым растворам красителя. Сухие мембраны нельзя сразу погружать в раствор, их следует осторожно, стараясь не вызвать образования пузырьков, положить на поверхность жидкости, чтобы раствор в них впитывался под действием капиллярных сил. Увлажненные мембраны можно погружать в раствор.

На полоску САМ толщиной 0,2—0,5 мм и шириной 2,5 см обычно наносят 0,2—1,0 мкл образца. Для стандартного разделения компонентов сыворотки с последующим фотометрическим определением используется до 3 мкл образца, содержащего 0,1—0,2 мг белка. Оптимальное количество образца зависит от метода обнаружения. Для колориметрического обнаружения после элюирования необходимо наибольшее количество образца, а для фотометрического и радиоизотопного обнаружения — наименьшее. Если проводится фотометрическое обнаружение, наименьшее количество образца требуется в тех случаях, когда

измеряется отражение света от полоски прозрачной САМ, положенной на белую подложку.

Среди коммерческих доступных типов мембран из САМ следует упомянуть 1) мембраны гомогенного типа, например «Oxoid Electrophoretic Strips», выпускаемые фирмой Oxo Ltd., Southwark Bridge Rd. (Лондон) или аналогичные мембраны фирмы Schleicher und Schüll, Dassel/Kreis Einbeck и 2) пропитанные с одной стороны мембраны производимые фирмой Soc. Chemetron Chimica, Via Gustavo Modena, 24 (Милан). Для разделения липопротеинов наиболее удобны мембраны типа «Hydro cellulose gel strips Chemetron No 1» той же фирмы. Мембраны для микропрепаративных разделений толщиной до 2,5 м выпускаются под названием «Cellogel blocks 6×17».

12.2.5. ТОНКОСЛОЙНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Методика разделения тонкослойным электрофорезом (ТСЭ) аналогична методике разделения ТСХ. Для получения незакрепленного слоя чаще всего используется тонкодисперсный силика-

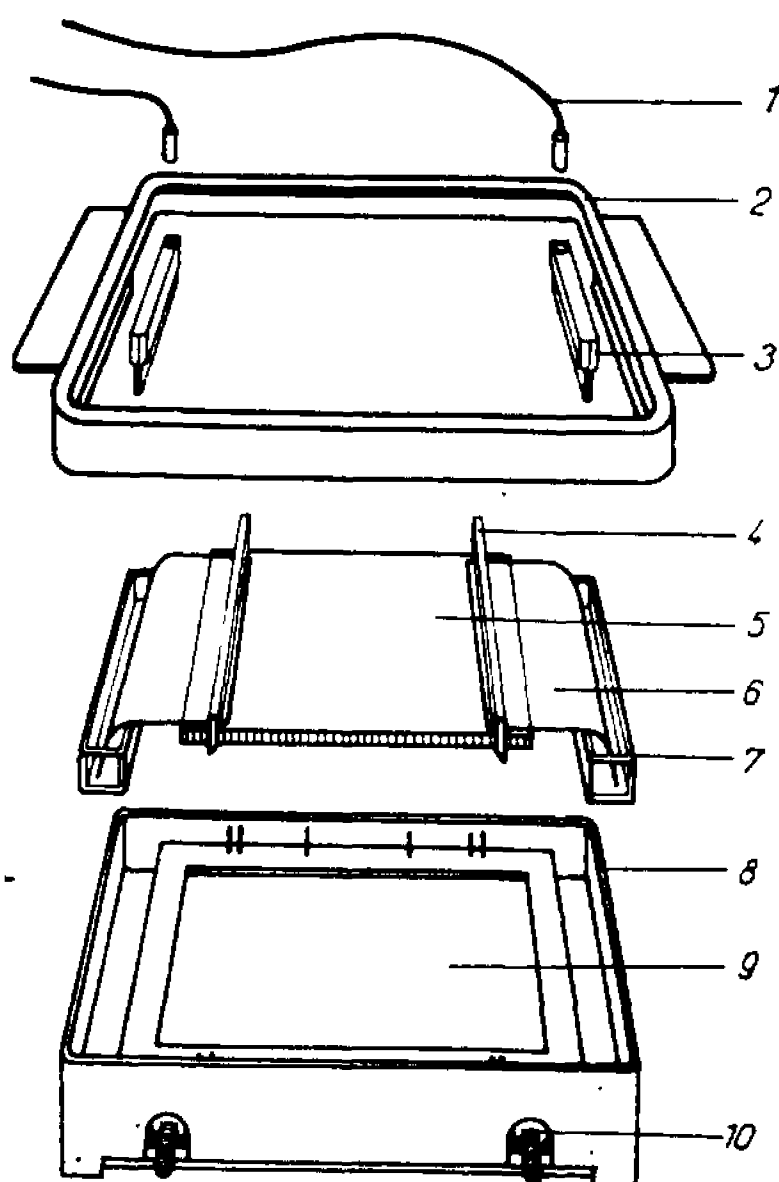


Рис. 12.7. Прибор для тонкослойного электрофореза [75].

1 — ввод тока; *2* — прозрачная крышка; *3* — соединения с платиновыми электродами; *4* — приспособления, прижимающие бумажные контакты к тонкому слою; *5* — стеклянная пластина с тонким слоем; *6* — бумажные токопроводящие контакты; *7* — электродная ячейка с электролитом; *8* — пластиковая (полипропиленовая) камера; *9* — изолированный блок охлаждения; *10* — ввод холодной воды. Этот прибор выпускает фирма CAMAG 4132 Muttenz, Homburgerstrasse 24, Швейцария.

Таблица 12.5

Буферные растворы для тонкослойного электрофореза (ТСЭ)

pH	Состав	Примечания
8,6 [74]	2,76 г диэтилбарбитуровой кислоты, 15,4 г диэтилбарбитурата натрия, вода до 1 л	Для трех пластин размером 200×200 мм с толщиной слоя 0,3 мм в 40 мл буферного раствора суспендируют 25 г силикагеля CAMAG DS-01[a] Разделение аминокислот (образцы по 5 мкг каждой) при 500 В в течение 120 мин; разделение методом ТСХ в перпендикулярном направлении можно вести в системе фенол — вода (3 : 1)
6,5 [28]	Пиридин — уксусная кислота — вода (300 : 10 : 2700)	32 г порошка целлюлозы MN 300[б], 192 мл воды, 8 мл этанола, толщина слоя 0,5 мм; вначале разделение методом ТСХ в системе амиловый спирт — изобутиловый спирт — пропиловый спирт — пиридин — вода (1 : 1 : 1 : 3 : : 3); последующее разделение методом ТСЭ в перпендикулярном направлении. Анализ триптического гидролизата бычьего актина — 15 мкл смеси пептидов (5 мг/мл)
3,4 [50]	0,05 М раствор формиата аммония	Порошок целлюлозы, например MN 300; 25 мкг гидролизата ДНК, 75 В/см, 30 мин, 0 °С; второе направление — ТСХ в системе насыщенный цитрат аммония — 1 М цитрат натрия — изопропиловый спирт (80 : 18 : 2)

[а] Продукт фирмы CAMAG, 4132 Muttenz (Швейцария).
[б] Продукт фирмы Macherey-Nagel, Düren (ФРГ).

гель. Преимущество метода ТСЭ — возможность применения универсальных обнаруживающих реагентов (тех же, что и в ТСХ). Биохимический анализ проводят на слоях тонкогранулированной целлюлозы, к которой для сохранения влажности и улучшения прилипания слоя к подложке добавляют небольшое количество очень тонкого сефадекса. Порошок крахмала в настоящее время применяется реже. Для анализа некоторых типов препаратов пригоден синтетический тонкогранулированный

материал на основе поливинила — певикон, поставляемый фирмой Superfosfat Bolaget (Стокгольм). Размеры пластинок обычно соответствуют размерам стандартных пластинок для ТСХ, т. е. 200×200 или 200×100 мм. Примеры буферных растворов для ТСЭ приведены в табл. 12.5. Приборы для ТСЭ обычно дают выход 0,10—0,15 Вт/см^2 при градиенте напряжения до 60 В/см. Длительность разделения в зависимости от типа образца и буферного раствора составляет от 20 до 120 мин. Если после проведения ТСЭ высушить слой, то можно в перпендикулярном направлении провести второе разделение методом ТСХ или опять ТСЭ и в результате получить «карту». Если условия первого и второго (в перпендикулярном направлении) разделения идентичны, то в промежутке между разделениями можно провести химическую реакцию. В результате реакции подвижность ряда соединений изменится, и они отклонятся от диагонали, на которой расположатся немодифицированные компоненты. На рис. 12.7, показана схема прибора для ТСЭ, выпускаемого фирмой CAMAG.

12.2.6. ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

С самого начала применения электрофореза для стабилизации зон использовались гели. В 1946 г. с этой целью был применен силикагель, а 1949 г. — гель агара [30]. Эти гели используются и в настоящее время, особенно в аналитических целях. Расширение области применения гелей при электрофорезе белков связано с работой Смитиса [91], который использовал молекулярно-ситовые свойства геля крахмала. Это гель особенно удобен для аналитических работ (см. рис. 12.28). При проведении препаративных разделений следует учитывать некоторую загрязненность элюата полисахаридами, которые вымываются из матрицы геля. Аналогичное загрязнение элюата наблюдается и при разделении на геле агара и силикагеле, который содержит большое количество неорганических примесей. Наличие ионогенных групп подтверждается четким электроосмотическим потоком. Электроосмос вызывает сдвиг зон в одном направлении, что искажает профиль разделения. В агарозном геле, свойства которого по другим признакам сходны с агаровым гелем, содержание ионогенных групп существенно ниже.

Гель агарозы также можно смешивать с полиакриламидным гелем в тех случаях, когда макропористый полиакриламидный гель с низкой плотностью не пригоден по своим механическим свойствам [15].

Макропористые гели, особенно гели агара и агарозы, наиболее широко используются в методе иммуноэлектрофореза [31]: разделенные методом электрофореза соединения диффундируют в направлении, перпендикулярном направлению электрофореза,

навстречу антителам, диффундирующим в противоположном направлении. При контакте разделенных антигенов и антител образуются характерные дуги осаждения. Отличающийся высокой чувствительностью иммуноэлектрофорез был усовершенствован путем введения радиоактивной метки в антигены, и в настоящее время радиоиммуноэлектрофорез [110] является одним из самых чувствительных аналитических методов анализа биополимеров. В методе «взлетающей ракеты» (fused-rocket) [57, 94] иммунопреципитация происходит в процессе электрофоретической миграции в блоке геля. При разделении этим методом антитела равномерно диффундируют в гель и не перемещаются во время электрофореза. Этот быстрый метод пригоден для избирательного количественного анализа большого числа фракций.

Полиакриламидный гель наименее химически активен. Его слабое сродство к красителям позволяет осуществлять быстрое обнаружение биополимеров, главным образом белков, нуклеиновых кислот и продуктов их деградации, с помощью окрашивания. Прозрачный полиакриламидный гель обладает хорошими механическими свойствами, допускающими изменение концентрации полиакриламида в самых широких пределах. Электроосмотические эффекты в этом геле очень малы. Условия аналитических и препаративных разделений на полиакриламидном геле путем зонного электрофореза в гомогенных и дискретных системах буферных растворов [48, 77], а также изотахофореза и изоэлектрического фракционирования хорошо изучены.

12.2.7. ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ПРИ ГРАДИЕНТЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПОЛИАКРИЛАМИДА (ПГЭ)

В этом методе электрофореза используется электрофоретическое перемещение макромолекул в среде с градиентом плотности пор геля. Конечный результат — разделение смеси на отдельные компоненты в соответствии с размерами молекул, при этом электрофоретическая подвижность не играет существенной роли. Необходимым условием такого разделения является наличие у исследуемых соединений зарядов одного типа и отличной от нуля электрофоретической подвижности в применяемой среде. Движение веществ от старта постепенно тормозится вследствие уменьшения пор геля, и с увеличением расстояния от старта подвижность макромолекул постепенно уменьшается. При больших молекулярных массах подвижность уменьшается почти до нуля. Ограничение подвижности, вызываемое гелем, приводит к фокусированию зон. Для того чтобы подвижность снижалась до нуля, наряду с градиентом концентрации акриламида необходимо наличие градиента степени сшивки геля. Поэтому в новых типах гелей имеется градиент концентраций и полиакриламида, и бисакриламида. На этих гелях можно разде-

лять и фокусировать зоны соединений с молекулярной массой от $2 \cdot 10^4$ до $8 \cdot 10^6$. Совместное влияние градиента концентраций полиакриламида и сшивающего реагента бисакриламида показано на рис. 12.8 на примере разделения белков на продажном геле «Gradipore Survey Gel». Метод удобен тем, что постоянство

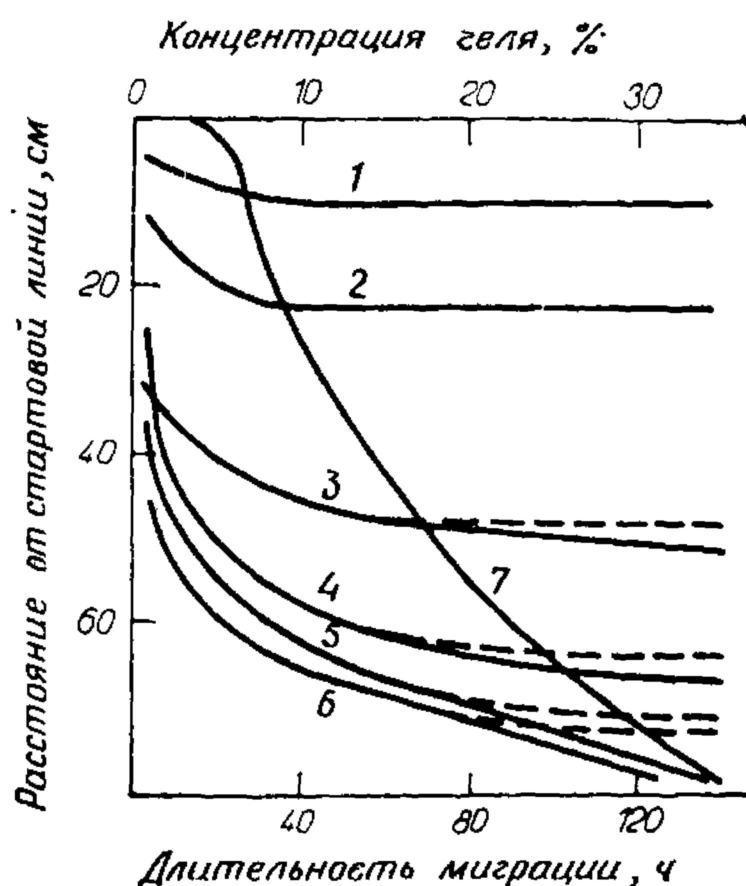


Рис. 12.8. Зависимость расстояния, на которое мигрируют зоны белков различной молекулярной массы, от длительности электрофореза при данном градиенте концентрации полиакриламидного геля (с разрешения фирмы Isolab Inc.).

1 — β-липопротеин (мол. масса $2 \cdot 10^6$); *2* — α-макроглобулин (мол. масса $1{,}5 \cdot 10^5$); *3* — α-трансферрин (мол. масса $6{,}9 \cdot 10^4$); *4* — концентрация геля в зависимости от расстояния от стартовой линии (5% бисакриламида); штриховая линия — влияние увеличения степени сшивки при использовании градиента концентрации сшивающего реагента бисакриламида (2,5—27% полиакриламида и 4—6% бисакриламида). Плоские слои геля Gladipore Survey Gel с градиентом концентрации полиактиламида выпускает фирма Isolab Inc., Acron, Ohio, 44221, США.

напряжения, электрического тока и длительности разделения не относятся к числу необходимых условий. Обычно достаточно применения буферного раствора одного и того же типа при двух концентрациях. Недостаток метода — относительная длительность разделения — компенсируется хорошей воспроизводимостью положения зон. Таким способом можно также определять молекулярные массы. Получение градиента концентрации полиакриламида подробно рассматривается в разд. 12.7.3.

12.2.8. ДИСКРЕТНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

ОСНОВЫ МЕТОДА

Гель-электрофорез в дискретной системе буферов был впервые использован Пуликом [77], а теория метода (применительно к полиакриламидному гелю) была разработана Дэвисом

[16] и Орнштейном [73]. Метод дискретного электрофореза, описанный этими авторами, или метод так называемого многофазного [48] зонного электрофореза в полиакриламидном геле, предусматривает объединение двух основных принципов электромиграции. На начальной стадии разделения происходит процесс фокусирования, сходный с изотахофорезом (см. разд. 12.3), который постепенно трансформируется в процесс зонного элек-

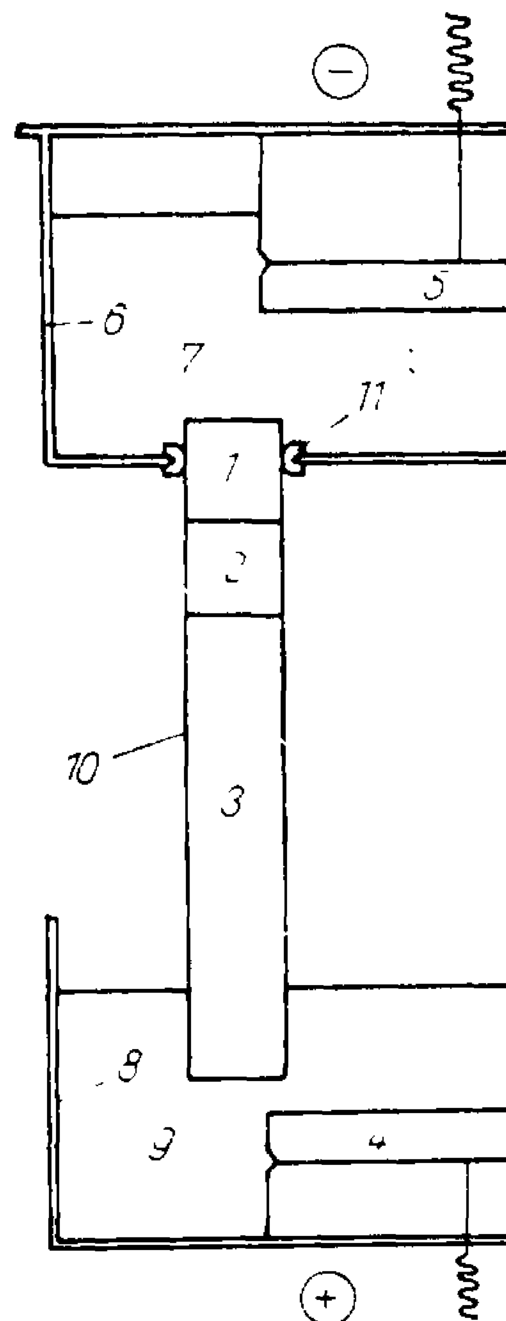


Рис. 12.9. Схема дискретного колоночного электрофореза в полиакриламидном геле.

1 — слой геля с образцом; *2* — фокусирующий гель; *3* — разделяющий гель; *4* — нижний электрод, платиновая проволока; *5* — верхний электрод, платиновая проволока; *6* — верхняя электродная ячейка; *7* — верхний электролит; *8* — нижняя электродная ячейка; *9* — нижний электролит; *10* — стеклянная трубка; *11* — кольцевое резиновое уплотнение. Полярность электродов установлена для электрофореза анионов; для разделения катионов, например основных белков, полярность должна быть обратной.

трофореза на геле, обладающем свойствами молекулярного сита.

Раствор образца перед нанесением либо сгущают, например добавляя сахарозу, либо вводят в слой геля при его полимеризации (рис. 12.9). За слоем, содержащим образец, следует слой «фокусирующего геля с равномерной низкой концентрацией полиакриламидного геля. В этом слое компоненты образца после их миграции из геля с образцом концентрируются в зону, в которой они с различной степенью разделения следуют друг за другом. На этом этапе сфокусированные компоненты образца переходят в следующий слой более концентрированного «разделяющего» геля. Электрофоретическая подвижность макромолекулярных соединений уменьшается до такой степени, что низкомолекулярный «замыкающий» ион догоняет концентрирован-

ные зоны макромолекулярных веществ и постепенно замещает «ведущий» ион во всем объеме геля. В образующейся таким образом гомогенной среде, содержащей этот ион и буферный компонент противоположного заряда, отдельные зоны макромолекул мигрируют с различной скоростью. В аналитических целях разделение ведут в течение определенного отрезка времени, а при препаративном разделении дают компонентам смеси пройти определенное расстояние, связанное с зоной элюирования.

МЕТОДИКА АНАЛИТИЧЕСКОГО ДИСКРЕТНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Электрофорез проводят в стеклянных трубках длиной около 70 мм с внутренним диаметром около 5 мм. Перед употреблением трубки тщательно промывают смесью хромовой и серной кислот или горячей азотной кислотой, водой и в заключение ацетоном. Сухие трубки держат вертикально и дно их закрывают резиновым уплотнением так, чтобы резина не входила в трубку. В качестве уплотнения можно использовать резиновые крышки к флаконам для сыворотки, перевернув их наоборот. Исходные растворы для приготовления геля (см. табл. 12.6 и 12.7) хранятся при 4 °C в темных бутылях, которые выдерживают при комнатной температуре и откачивают водоструйным насосом, чтобы уменьшить содержание кислорода, ингибирующего полимеризацию. Если нижняя часть столбика геля не достаточно ровная, то в каждую трубочку вводят 0,1 мл 40%-ного раствора сахарозы и осторожно покрывают смесью для полимеризации разделяющего геля (табл. 12.7) до заранее отмеченной высоты, например 50 мм, т. е. около 2 мл смеси для полимеризации. Далее этот слой сразу же очень осторожно из шприца с тонкой иглой (по стенке трубки) покрывают 0,1 мл воды. Во время полимеризации трогать трубки не рекомендуется. После завершения полимеризации разделяющего геля воду удаляют ватным тампоном. Сухую поверхность разделяющего геля сначала промывают примерно 0,1 мл раствора для приготовления промежуточного геля (табл. 12.8), затем вводят 5 мм слоя (0,2 мл) раствора для приготовления промежуточного геля и быстро и осторожно покрывают 0,1 мл воды. Трубку освещают сверху флуоресцентной лампой со спектром дневного света, удаленной максимум на 50 мм. После окончания фотополимеризации слой воды удаляют, а поверхность геля промывают либо буферным раствором из верхней электродной камеры (табл. 12.9), если образец наносят в растворе, либо вновь раствором для приготовления фокусирующего геля, в который вместо воды добавляют образец. Если анализируются химически лабильные соединения, например ферменты, образец лучше наносить в виде

Таблица 12.6

Выбранные системы[а] и состав гелей и буферных растворов для дискретного электрофореза в полиакриламидном геле в соответствии с молекулярной массой и зарядом образца

Молекулярная масса		$>10^6$ $10^5 \geq$ мол. масса $\geq 10^4 < 10^4$						
Концентрация акриламида, %		3,75	5,0	7,5	10	15	22,5	30
Положительно заряженный образец	Электродный буфер, pH 4,5			S16	S16			
	Фокусирующий гель, pH 5,0			S15	S15			
	Разделяющий гель, pH 3,8			S14	S17			
Отрицательно заряженный образец	Электродный буфер, pH 7,0			S13				
	Фокусирующий гель, pH 7,0			S12				
	Разделяющий гель, pH 8,0			S11				
	Электродный буфер, pH 8,3	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3
	Фокусирующий гель, pH 8,3	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S2
	Разделяющий гель, pH 9,5	S4	S5	S6[б]	S7	S8	S9	S10

[а]Составлено согласно данным [27]. См. табл. 12.7—12.9.

[б]Вместо S6 можно также использовать S1; в этом случае концентрацию геля следует уменьшить на 0,5%.

раствора после добавления к нему 10%-ного раствора сахарозы. Для анализа сложных смесей необходимо до 0,2 мг образца, для анализа более простых смесей достаточно меньшего их количества, до 0,01 мг. Если образец не полимеризуется, его наносят только после того, как трубка с гелем закреплена в приборе. Трубки, закрепленные вертикально в верхней части прибора, погружают в нижний электролит, пузырьки воздуха из нижних участков геля тщательно удаляют загнутой пипеткой. Верхнюю электродную камеру заполняют соответствующим электродным буферным раствором, к которому добавляют краситель (3 капли насыщенного раствора красителя на 250 мл раствора). Краситель указывает фронт однородной фазы, содержащей зоны образца. При разделении анионов используется раствор бромфенолового синего, при разделении катионов — раствор метиленового зеленого. Подготовленный таким образом

Таблица 12.7

Состав растворов для получения разделяющих гелей при дискретном электрофорезе (приведенные номера систем соответствуют указанным в табл. 12.6)

Номер	Концентрация, %			Исходный раствор (приведенные количества доводятся до 100 мл водой)	Смесь для полимеризации (по объему)
	акриламида	бисакриламида	pH		
S1	7	0,18	8,9	а) 48 мл 1 н. HCl+36,3 трис-буфера+0,23 мл TEMED б) 28 г акриламида+0,735 г Бис в) 0,14 г персульфата аммония	1а+1б+2в
S4	3,75	0,3	8,9	а) Как в S1 б) 15 г акриламида в) 4,0 мг рибофлавина г) H_2O	1а+2б+1в+4г
S5	5	0,25	8,9	а) Как в S1 б) 20 г акриламида+1 г Бис в) Как в S4 г) H_2O	1а+2б+1в+4г
S6	7,5	0,18	8,9	а) Как в S1 б) 30 г акриламида в) 0,735 г Бис	1а+1б+2в
S7	10	0,10	8,9	а) Как в S1 б) 60 г акриламида+0,6 г Бис в) Как в S1 г) H_2O	1а+1,34б+4в+1,66г

S8	15	0,1	8,9	а) Как в S1 б) Как в S7 в) Как в S1	1а+3б+4в
S10	30	0,2	8,9	а) Как в S1 б) Как в S7 в) 0,18 г персульфата аммония	1а+4б+3в
S11	7,5	0,2	7,5	а) 48 мл HCl+6,85 г трис-буфера+0,46 мл TEMED б) 30 г акриламида+0,8 г Бис в) Как в S1 г) H_2O	1а+2б+4в+1г
S14	7,5	0,2	4,3	а) 48 мл 1н. KOH+17,2 мл уксусной кислоты+4,0 мл TEMED б) Как в S11 в) 0,28 г персульфата аммония г) H_2O	1а+2б+4в+1г
S17	15	0,1	4,3	а) Как в S4 б) 10 г акриламида в) Как в S14 г) H_2O	1а+2б+4в+1г

[a] Используемые сокращения: TEMED — тетраметилэтилендиамин; Бис — N,N′-метиленбисакриламид.

Таблица 12.8

Состав растворов для получения фокусирующих гелей при дискретном электрофорезе (приведенные номера смесей соответствуют указанным в табл. 12.6)

Номер	Исходный раствор (данные количества доводятся до 100 мл водой)[a]	Смесь для полимеризации геля (по объему)
S2	а) 5,98 г трис-буфера+0,46 мл TEMED+ + ~48 мл 1 н. HCl до pH 6,7	1а+1б+1в+1г+4д
	б) 10 г акриламида+2,5 г	
	в) 4,0 мг рибофлавина	
	г) H_2O	
	д) 40 г сахарозы	
S12	а) 39 мл 1 М H_3PO_4+4,95 г трис-буфера+0,46 мл TEMED	1а+2б+1в+4г
	б) Как в S2	
	в) Как в S2	
	г) Как в S2	
S15	а) 48 мл 1 н. KOH+2,87 мл уксусной кислоты+0,46 мл TEMED	1а+2б+1в+4г
	б) Как в S2	
	в) Как в S2	
	г) H_2O	

[a]Сокращения те же, что и в табл. 12.7.

Таблица 12.9

Электродные буферные растворы для дискретного электрофореза (приведенные номера смесей соответствуют указанным в табл. 12.6)

Номер	Состав буферного раствора (данные количества доводятся до 100 мл водой)	pH
S3	3,0 г трис-буфера+14,4 г глицина	8,3
S13	5,52 г диэтилбарбитуровой кислоты+1,0 г трис-буфера	7,0
S16	3,12 г β-аланина+0,8 мл уксусной кислоты	4,5

[a]Метиловый зеленый добавляется в верхнюю электродную камеру при анализе положительно заряженных образцов, а бромфеноловый синий — при анализе образцов с отрицательным зарядом. Красители показывают фронт разделяющей фазы в геле.

прибор помещают в холодильник, где поддерживается постоянная температура (4 °С). Полярность выбирают в соответствии с зарядом разделяемых ионов (если разделяются анионы, положительный полюс должен быть внизу, если разделяются катионы, положительный полюс должен находиться наверху). Напряжение выбирают таким, чтобы сила тока в одной трубке не превышала 2 мА (до 4 мА для менее сложных разделений). Если возможно, рекомендуется пользоваться источником питания (до 500 В) со стабилизованным током. Как только зона краси-

теля достигнет нижнего конца разделяющего геля, электрофорез прекращают. Если образцы содержат нежелательные соли, зоны мигрируют более медленно и получаются менее узкими. В таких случаях трубки вынимают (после отключения источника питания), чтобы определить расстояние, на которое переместился краситель, образующиеся в верхнем электродном сосуде отверстия закрывают пробками и продолжается разделение. В охлажденные, содержащие гели, трубки (держат в одной руке) из шприца с тонкой иглой (держат в другой руке) постепенно по внутреннему периметру трубки между гелем и стеклом вводят воду или более эффективный раствор глицерина (~10%-ный). Чтобы избежать попадания на кожу токсичного акриламида и не загрязнить гель, перед проведением этих операций следует надеть тонкие перчатки.

ОБНАРУЖЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ ОКРАШИВАНИЯ ПОЛИАКРИЛАМИДНОГО ГЕЛЯ

Наиболее надежными и универсальными красителями для белков являются амидовый черный 10В [109] и кумасси синий [12]. Наибольшее распространение получил универсальный краситель «Stains-all» [15], который окрашивает рибонуклеиновую кислоту в голубовато-розовый цвет, дезоксирибонуклеиновые кислоты и белки — в красный, кислотные полисахариды — в синий.

а. Окрашивание амидовым черным 10В. Гели погружают на 1—4 ч в профильтрованный 1%-ный раствор красителя [Amidoschwarz 10B, extra puriss., Serva (Гейдельберг)] в 7%-ной уксусной кислоте. Избыток красителя удаляют диализом или электродиализом (методика обесцвечивания описана ниже).

б. Окрашивание кумасси синим. Гели погружают на 30 мин в 12,5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты. Чтобы увеличить чувствительность, концентрацию кислоты можно повысить до 20%, а длительность окрашивания увеличить до 60 мин. По окончании выдержки гели переносят в 0,05%-ный раствор кумасси синего [Coomassie Blue R250, Serva (Гейдельберг)] в 12,5%-ной трихлоруксусной кислоте и выдерживают в ней 30—60 мин. Окрашивающий раствор получают, разбавляя свежеприготовленный 1%-ный раствор красителя в 12,5%-ной трихлоруксусной кислоте. С целью увеличения чувствительности окрашивание можно повторить при той же или при удвоенной концентрации красителя, а также увеличить длительность окрашивания. Избыток красителя удаляют диализом (методика обесцвечивания описана ниже).

в. Окрашивание универсальным красителем «Stains-all». 0,1%-ный раствор красителя «Stains-all» [бромид 1-этил-2-[3-

(1-этилнафто[1,2d]тиазолин-2-илидин) - 2-метилпропенил]нафто-[1,2d]тиазолия, Serva (Гейдельберг)] в 100%-ном формамиде разбавляют в соотношении 1 : 20, чтобы конечная концентрация формамида в воде составляла 50%. Сосуд с погруженным в раствор гелем заворачивают в алюминиевую фольгу, чтобы на него не попадал свет, и оставляют на ночь. Избыток красителя удаляют, промывая гель проточной водой.

ОБЕСЦВЕЧИВАНИЕ ГЕЛЯ ПОСЛЕ ДИСКРЕТНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Обесцвечивание гелей после обнаружения зон кумасси синим происходит с достаточной скоростью в процессе диализа в 12,5%-ной трихлоруксусной кислоте. Самым простым, но длительным способом удаления из геля избытка амидового черного 10B также является обычный диализ. Гели, имеющие форму

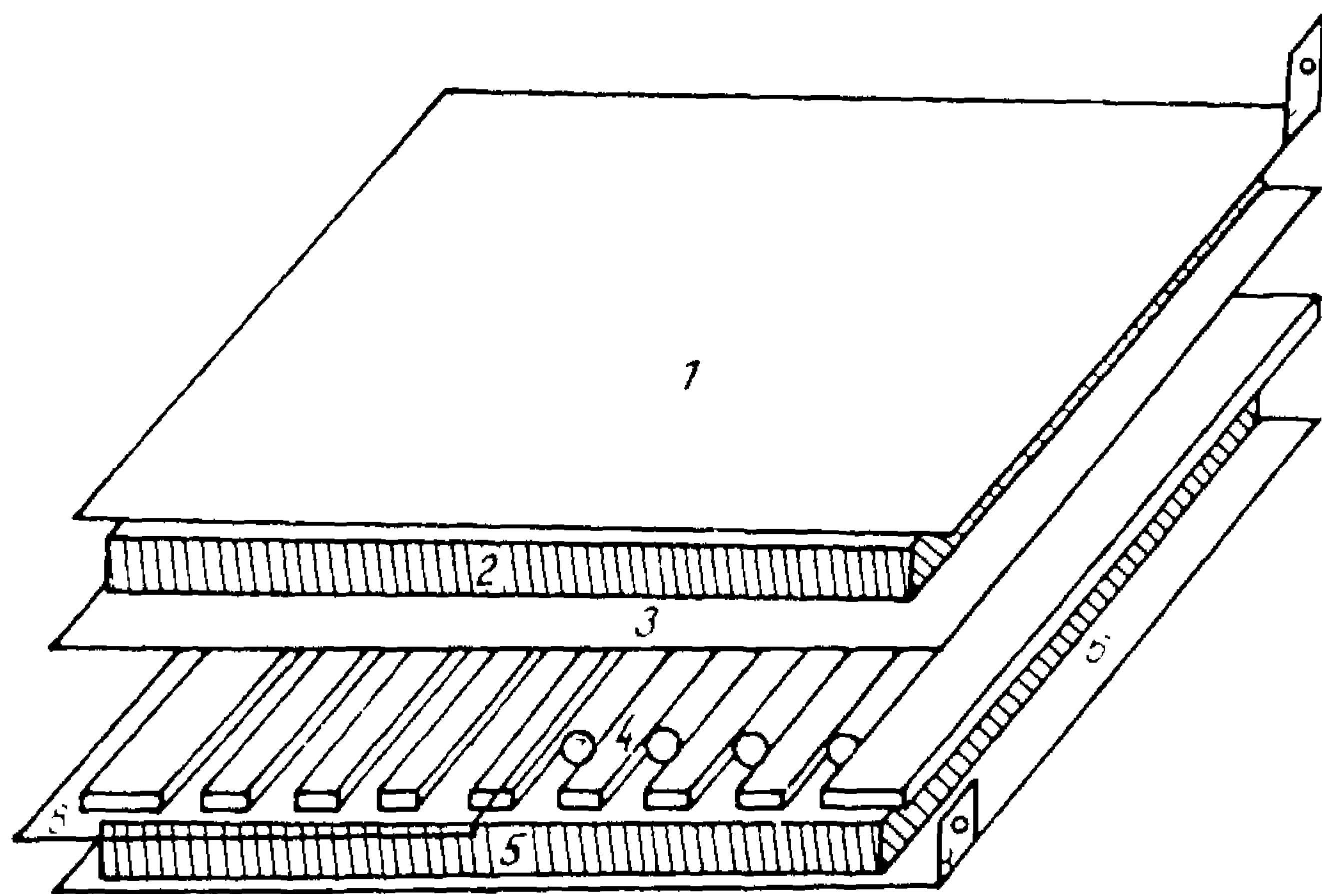


Рис. 12.10. Аппарат для обесцвечивания столбиков полиакриламидного геля после дискретного электрофореза [78].

1 — катод из нержавеющей стали; *2* — вискозная губка однородной пористости (в разрезе); *3* — мембрана для диализа фирмы Kalle A. C. (Висбаден — Бибрих, ФРГ); *4* — разделяющая гребнеподобная прокладка из буна-каучука; *5* — вискозная губка (в разрезе); *6* — анод — лист нержавеющей стали; *7* — столбики полиакриламидного геля; *8* — полиэтиленовая пленка, закрывающая незанятые прорези.

стержней с круглым сечением, помещают в пробирки и заливают 7%-ной уксусной кислотой, которую по мере необходимости меняют. Обесцвечивание занимает примерно один день. Обесцвечивание можно ускорить, если раствор кислоты будет циркулировать и извлеченный им краситель будет сорбироваться на активном угле.

Гораздо более эффективным методом обесцвечивания является электродиализ. Этот метод используется для быстрого выявления зон с высокой концентрацией белка. Для проведения электролиза достаточно простого нестабилизованного источника постоянного напряжения. Требуемый ток зависит от направления электродиализа в геле. С помощью электродных сосудов и источника питания, аналогичных применяемым при дискретном электрофорезе, удается осуществить более длительный и более сложный продольный электродиализ. Гели, имеющие форму круглых столбиков, помещают в трубки, диаметр которых лишь немного больше диаметров столбиков. В нижней части трубки сужаются, так что гель образует затвор. Электродные камеры и трубки с гелем заполняют 7%-ной уксусной кислотой. После включения тока за процессом обесцвечивания можно наблюдать визуально. Наиболее быстрым методом обесцвечивания является электродиализ в направлении, перпендикулярном длинной оси геля. Для проведения обесцвечивания разработаны специальные приборы, выпускаемые рядом фирм. В маленьком приборе конструкции Прусика [78] обесцвечивание можно провести за 30—45 мин. Этот прибор (рис. 12.10) можно легко изготовить в любой лаборатории.

МЕТОДИКА ОБЕСЦВЕЧИВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ ПРИБОРА КОНСТРУКЦИИ ПРУСИКА

Вискозную губку *5*, расположенную на анодной пластине *6*, тщательно насыщают 70%-ной уксусной кислотой. На верхней стороне губки расположен гребнеобразный сепаратор *4*, в который вставляют столбики геля. Поверх образцов геля помещают другую вискозную губку и накрывают ее целлофановой пленкой, на которую ставят катодную пластину. Все эти слои скрепляют тонкими резинками; проделать это следует очень осторожно, так как иначе можно выжать жидкость из губки. Чтобы прибор работал нормально, столбики геля должны контактировать с источником питания с двух сторон; при этом они не должны выступать из блока. Блок помещают в чашку Петри (катодом кверху). Для одного столбика геля достаточно напряжения 25—50В при силе тока 25—30 мА. Через 25—40 мин работы прибор выключают, разъединяют и столбики геля вставляют в пробирки с 7%-ной уксусной кислотой. Используемая вискозная губка должна быть мелкопористой и однородной. Если плотность тока увеличивается или обесцвечивание проводится слишком долго, может происходить частичное высушивание или окрашивание геля. Если данная вискозная губка всегда помещается у одного и того же электрода, ее не нужно отмывать после процесса обесцвечивания, а достаточно просто выжать.

12.3. ИЗОТАХОФОРЕЗ

12.3.1. ТЕОРИЯ МИГРАЦИИ ИОНОВ В УСЛОВИЯХ ИЗОТАХОФОРЕЗА

Процесс изотахофореза можно применять как к катионам, так и к анионам. В качестве примера мы рассмотрим изотахофорез катионов. Все приведенные выводы справедливы для анионов, если полярность обратная.

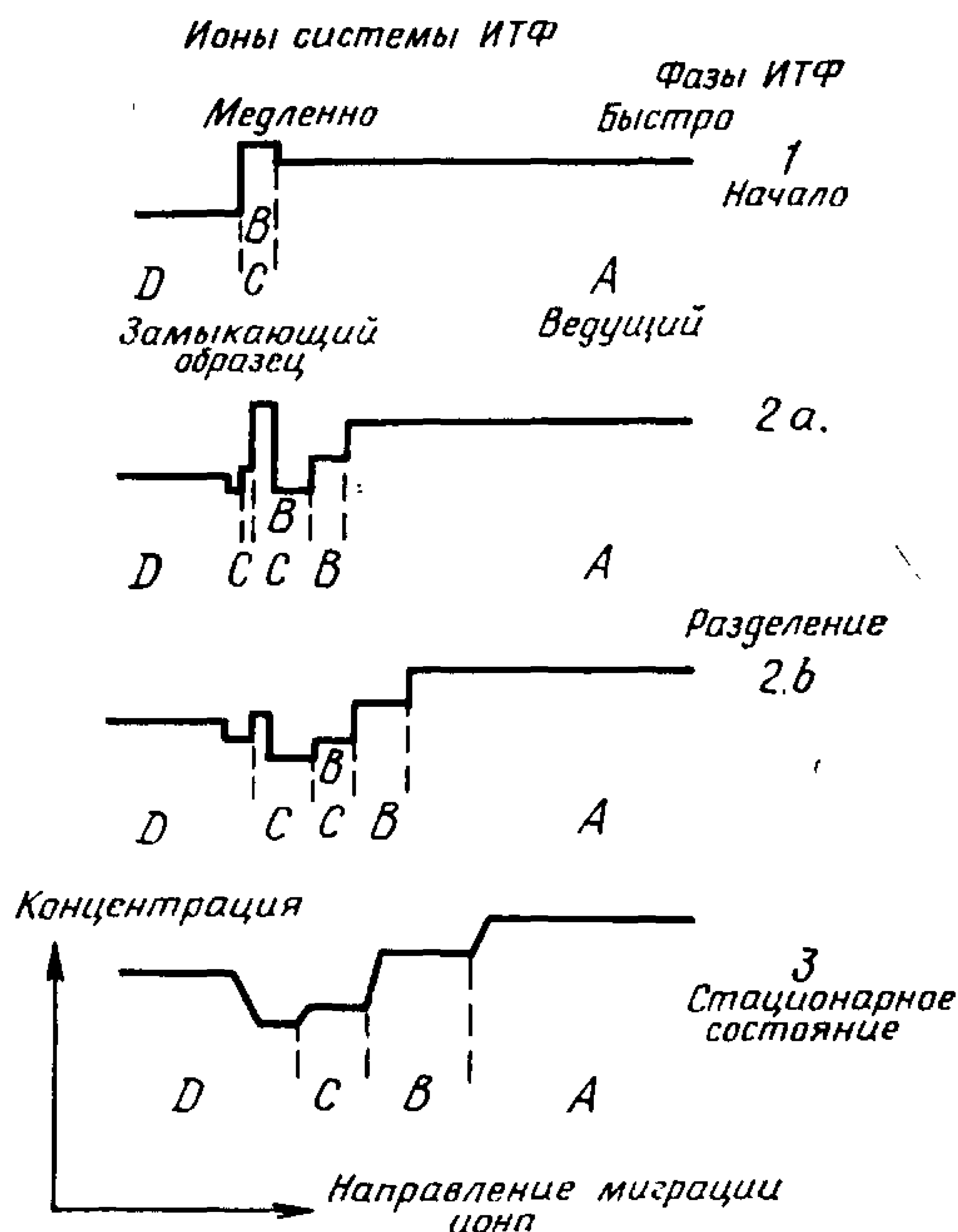


Рис. 12.11. Схема отдельных фаз изотахофоретического разделения.

Электрофоретическая подвижность ионов уменьшается в ряду: $U_A > U_B > U_C > U_D$. Фазы *2а* и *2б* аналогичны соответствующим фазам процесса разделения с подвижной границей. После достижения фазы *3* форма и длина зон больше не меняются.

В электрическом поле ближайший к катоду электролит содержит катион с максимальной во всей системе электрофоретической подвижностью u_{max}, а ближайший к аноду электролит содержит катион с самой низкой электрофоретической подвижностью u_{min}. Если раствор смеси электролитов с промежуточными подвижностями u_I ($u_{max} > u_I > u_{min}$) поместить между этими электролитами и пропустить через них электрический ток, то в этих условиях будет происходить изотахофоретическое разделение катионов, в процессе которого катионы образца перемещаются в порядке уменьшения подвижности позади самого быст-

рого «ведущего» катиона. Самый медленный катион системы замыкает этот ряд ионов и остается ближайшим к аноду. После того как наступит равновесие изотахофореза и зоны расположатся в определенном порядке, их скорость миграции станет равна скорости перемещения границы между «ведущим» катионом и следующим самым быстрым катионом. Согласно функции Кольрауша

$$\sum (c_i/u_i) = \text{const}, \tag{12.12}$$

сумма отношений концентрации отдельных ионов c_i и их соответствующих подвижностей представляет собой постоянную величину.

Для зон катионов *1* и *2* применимо уравнение (12.13), связывающее отношение концентраций катиона c_1, c_2 с абсолютными значениями z_1, z_2 соответствующих зарядов:

$$\frac{c_1}{c_2} = \frac{u_1}{u_1 + u_p} \cdot \frac{u_2 + u_p}{u_2} \cdot \frac{|z_1|}{|z_2|}, \tag{12.13}$$

где u_p — ионная подвижность аниона, мигрирующего в противоположном направлении; $u_1/(u_1+u_p)$ — число переносов катиона *1* в зону. Из этого уравнения следует, что процесс можно регулировать в широких пределах, меняя тип или концентрацию электролита. Различие в электрофоретических подвижностях в соответствующих узких зонах вызывает градиент потенциала, увеличивающий уменьшающуюся подвижность, в то время как концентрация катионов уменьшается от зоны к зоне. Все границы катионных зон, отличающихся истинной подвижностью u, мигрируют с одинаковой скоростью. Исходя из этого Хаглунд [36] и предложил называть этот метод изотахофорез (изо — равный, тахос — скорость). Если в каждой точке пространства, заполненного электролитом, сохраняются условия электронейтральности, то чем медленнее происходит изотахофоретическое перемещение иона, тем быстрее должен перемещаться противоион, в нашем случае анион p, так как в единицу времени равное число противоположных зарядов должно проходить через определенное сечение. Ион должен иметь соответствующую растворимость и подвижность и должен забуферивать систему в требуемом диапазоне pH. Обычно более пригодны слабые кислоты, содержащие лишь несколько ионизующихся групп, pK_a которых близок к выбранному pH ведущего электролита и буферная емкость, следовательно, максимальна. При подходящем подборе противоиона p различия в pH между зонами уменьшаются до минимума, даже если некоторый градиент pH не удается полностью исключить. Подробные данные о выборе электролитов в зависимости от свойств разделяемых веществ, включая амфо-

литы, можно найти в диссертациях Рутса [64], Эвераертса [20] и Бекерса [3]. Этот же вопрос подробно анализирует Джовин [48], чей метод многофазного зонного электрофореза (МЗЭ) с постоянным фокусированием зон практически представляет собой один из вариантов ИТФ.

В стационарном состоянии концентрация ионов в зонах равномерна, и ширина зоны пропорциональна общему количеству присутствующего иона. На ширину зоны может влиять концентрация ведущего иона, однако при препаративном разделении, когда важно выделить очень узкие зоны отдельных компонентов, удобно вводить в смесь соединения, выполняющие роль «прокладок» (spacer). Аналогичный принцип также успешно применяется при капиллярном анализе более сложных смесей. «Прокладки» — это вещества, ионы которых обладают промежуточной по сравнению с исследуемыми ионами подвижностью. Наряду с амфотерными прокладками в ИТФ используются прокладки с зарядом только одного типа. Общие требования, предъявляемые к прокладкам, — необходимая подвижность, хорошая растворимость, низкая молекулярная масса, небольшое поглощение в УФ-области и отсутствие взаимодействия с ионами образца.

12.3.2. КАПИЛЛЯРНЫЙ ИЗОТАХОФОРЕЗ

Изотахофорез малых количеств образца в ряде случаев целесообразнее вести в капилляре без носителя, используя стабилизующее влияние капиллярных сил. Выделяющееся тепло, при малом сечении капилляра легко отводится за счет теплопроводности, а фокусирующее влияние дискретного градиента электрического поля полностью используется в маленьких детекторах. Разрешающая способность детектора зависит от метода детектирования и геометрии капиллярного пространства. На рис. 12.12 показана схема прибора для капиллярного изотахофореза. Изотахофорез в капилляре был впервые проведен Константиновым и Ошурковой [54] в 1963 г. Впоследствии метод был усовершенствован сначала Эвераертсом [20], а затем Мартином и Эвераертсом [64].

Приборы для капиллярного ИТФ производятся фирмой LKB (Бромма, Швеция) и Shimadzu Seisakusho Ltd. (Токио, Япония). Приборы снабжены универсальными детекторами по тепло- и электропроводности и селективным УФ-детектором. Преимущество детектора по теплопроводности — простота конструкции, но его разрешающая способность на два порядка ниже, чем у детектора по электропроводности [100]. Большинство определений органических и природных соединений можно проводить с УФ-детектором при длинах волн 254, 280, 340 и 360 нм (см.

изотахофор 2127 фирмы LKB). Используя весь диапазон чувствительности УФ-детектора, можно анализировать от 0,1 до 0,01 нмолей веществ, в частности нуклеотидов. Концентрирования образца при этом не требуется. Обычно достаточно, если объем вводимого образца подобран так (для капилляра диаметром 0,45 мм и длиной 20—80 см обычно в пределах микролитра), чтобы не увеличивать ширину зоны. Мартин и Эвераертс [64] предложили для разрешения двух ближайших по подвижности

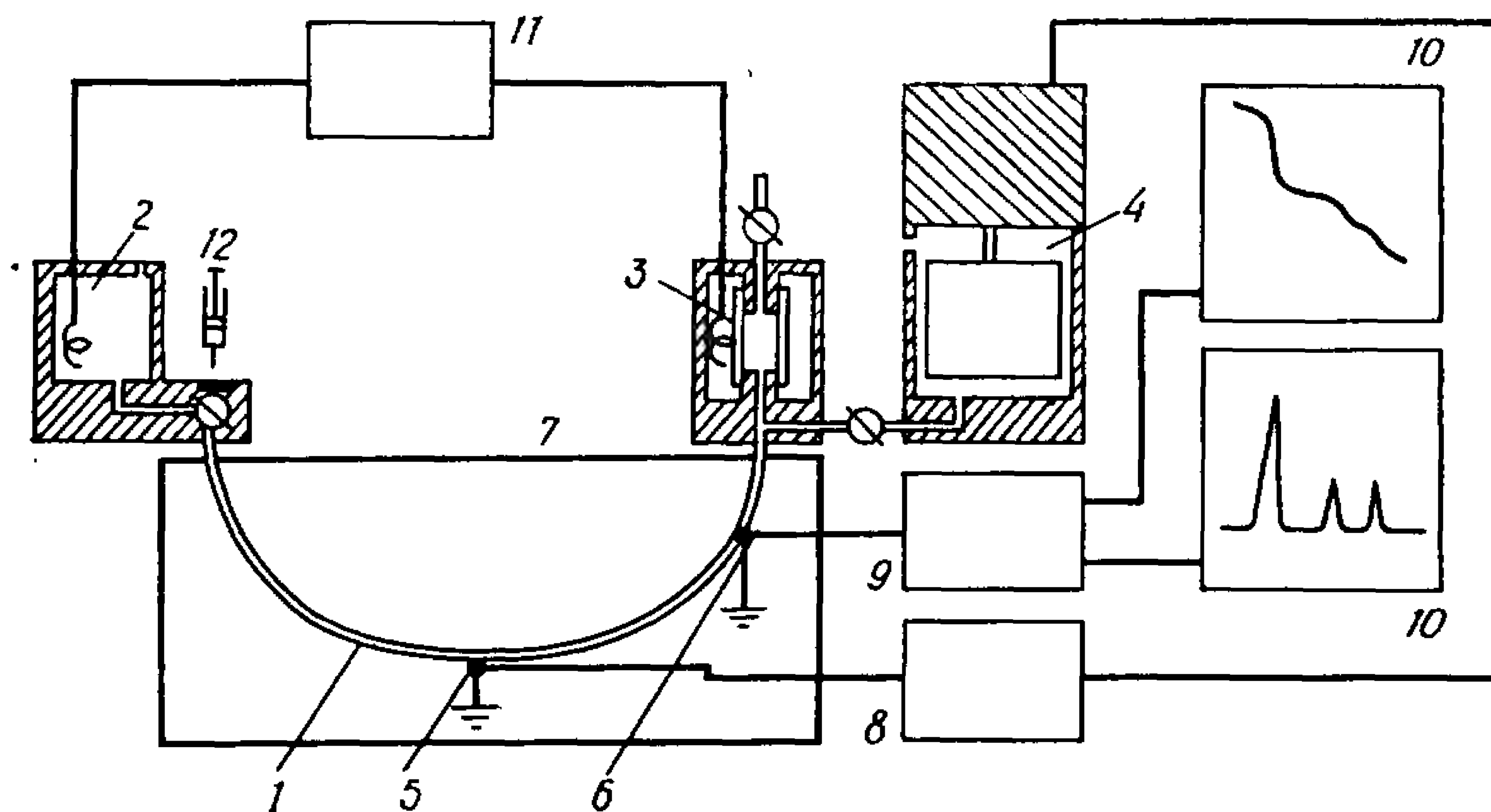


Рис. 12.12. Прибор для капиллярного изотахофореза с приспособлением для остановки зон под действием противотока.

1 — тефлоновый капилляр с внутренним диаметром 0,45 мм; *2* — электродная ячейка с замыкающим электролитом; *3* — электродная ячейка с ведущим электролитом с ацетатцеллюлозной мембраной; *4* — поплавок с соленоидом для регулирования противотока; *5* — регулирующая термопара противотока; *6* — термопара детектора; *7* — блок термостата; *8* — электронная цепь для регулирования противотока; *9* — усилитель сигнала; *10* — сбалансированные самописцы для записи сигналов зоны и ее производной; *11* — высоковольтный источник стабилизованного тока; *12* — ввод пробы.

компонентов соотношение между общим расстоянием миграции l, необходимым для разрешения, длиной зон после предполагаемого разделения Δl и подвижностью этих компонентов. Для расчета достаточно знать отношение подвижностей $\beta = u_2/u_1$ (определить которое несложно).

$$\Delta l/l = \Delta u/u = 1 - \beta \qquad (12.14)$$

Присутствие более легко разделяющихся ионов, существенно отличающихся по подвижности, не имеет большого влияния, так как пара трудно разделяющихся ионов уже отличается от других после короткого пробега в капилляре. Если длина капилляра известна, с помощью соотношения (12.14) можно определить максимальное количество смеси при известном β, которое можно определить качественно и количественно в данном капилляре.

КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

После разделения зон методом ИТФ в стационарном состоянии ни длина зон, ни концентрация в зонах не меняются. Если, наряду с этим, существует уверенность, что зоны движутся с постоянной скоростью, имеющееся количество вещества можно оценить, исходя из длины зоны. При этом качественный состав зоны можно оценить по падению потенциала в зоне, количеству выделяющегося тепла, электрическому сопротивлению или по оптическому поглощению. Установлено, что при постоянной скорости миграции зон через детектор в единицу времени (изотахофорез при постоянном токе) проходит одинаковое число зарядов. В этом случае напряжение в капилляре постепенно увеличивается пропорционально миграции зоны, а электролит, содержащий ведущий ион, который вначале заполняет все капиллярное пространство, замещается на мигрирующие зоны образца. После этого ионы замыкающего электролита движутся с максимальным электрическим сопротивлением, и при этом выделяется максимальное количество джоулева тепла. В ходе этого процесса электрическое сопротивление является величиной, качественно характеризующей ионы электролита данного состава. Чем ниже электрофоретическая подвижность, тем выше термический сигнал, т. е. тем выше падение потенциала в данной зоне.

Каждый из трех измеряемых параметров — джоулево тепло, градиент потенциала и электропроводность — дают ступенчатые кривые, высота шага которых постоянна для всей зоны и характерна для данного иона. Каждый из этих трех параметров можно использовать для универсального детектирования. Чаще всего определяется джоулево тепло; определяют его с помощью детектора по теплопроводности на поверхности тефлонового капилляра (рис. 12.12). Преимущество этого детектора — отсутствие непосредственного контакта между зоной и детектором, а его недостаток — на два порядка более низкая чувствительность, чем у контактных детекторов, регистрирующих электропроводность или напряжение (см. рис. 12.13). При применении контактных детекторов возможна нежелательная поляризация электрода, но эти детекторы отличаются высокой разрешающей способностью в диапазоне 0,01—0,1 мм. Характерные значения термического сигнала некоторых ионов приведены в табл. 12.10. Высота наблюдаемой волны измеряется либо относительно нулевого тока (абсолютная высота), либо относительно высоты волны ведущего электролита.

Важную качественную информацию можно также получить, определяя поглощение при выбранной длине волны [56]. Сигналы детектора записываются не непрерывно, что дает высокую разрешающую способность и высокую чувствительность и близ-

кую характеристику свойств зоны. Результаты определения УФ-поглощения и термического детектирования сравниваются на рис. 12.27. УФ-детектор особенно удобен при ИТФ биополиме-

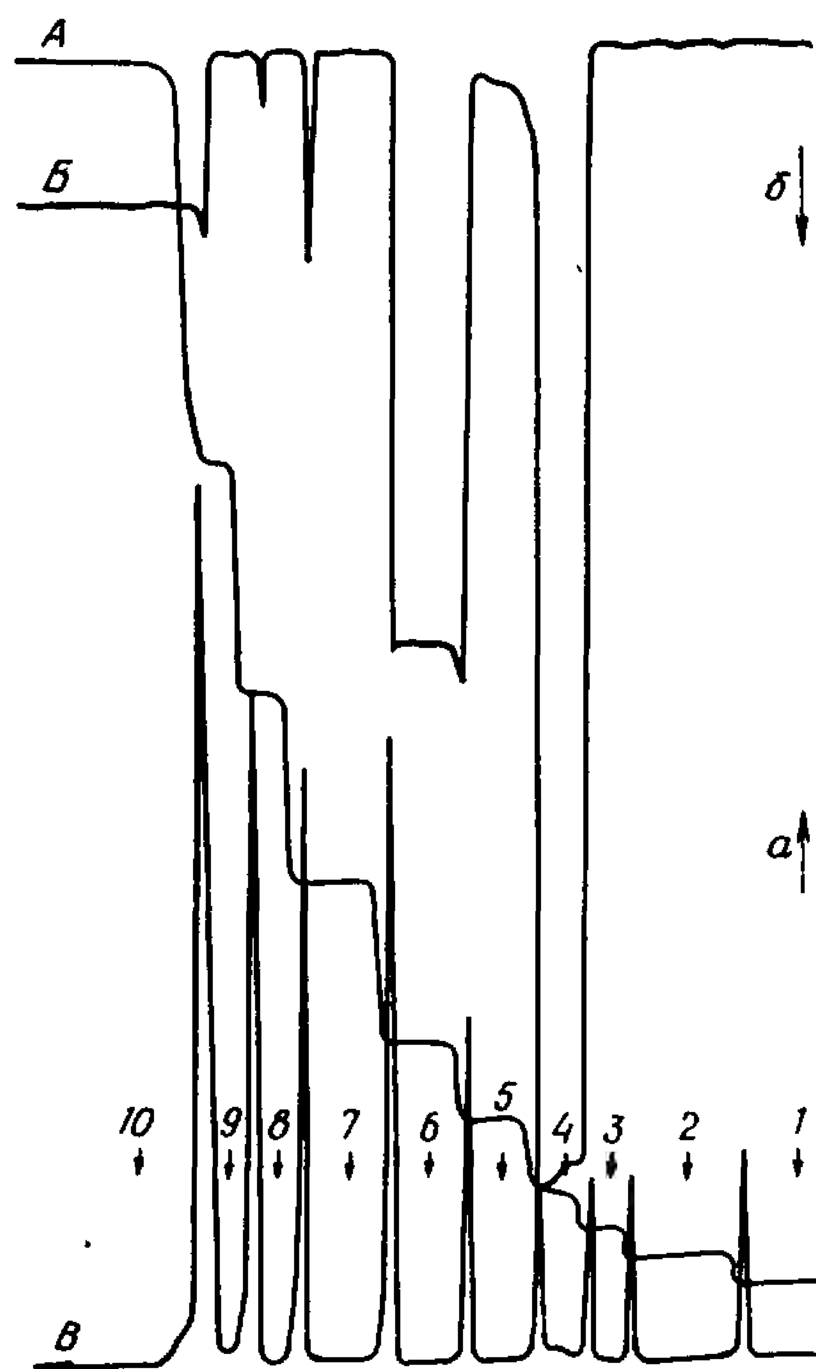


Рис. 12.13. Регистрация разделения анионов, проводимого методом капиллярного изотахофореза [21].

А — сигнал детектора по электропроводности (проводимость уменьшается в направлении стрелки *а*); *Б* — сигнал УФ-детектора (поглощение увеличивается в направлении стрелки *б*); *В* — запись производной сигнала детектора по электропроводности (сдвиг по временной оси); длина зон в направлении временной оси служит мерой количества вещества; оси *а* и *б* характеризуют природу ионов. Зоны анионов: *1* — хлорида, *2* — сульфата, *3* — хлората, *4* — хромата, *5* — малоната, *6* — пиразол-3,5-дикарбоксилата, *7* — адипината, *8* — ацетата, *9* — хлорпропионата, *10* — фенилацетата; звездочкой показан неидентифицированная зона. Ведущий электролит: 0,01 М HCl — гистидин, pH 6,0; замыкающий электролит: 0,01 М фенилуксусная кислота.

ров типа нуклеиновых кислот и продуктов их деградации, а также для специфического детектирования белков и их фрагментов [36, 56].

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

После достижения стационарного состояния ИТФ концентрация иона определенного типа по всему объему зоны не меняется. При постоянной скорости миграции, т. е. при постоянном то-

Таблица 12.10

Сравнение электрофоретической подвижности ионов в водной и метанольной среде с помощью капиллярного изотахофореза [4]

Ион	$u_{H_2O} \cdot 10^5$, $см^2/В \cdot с$ [а]	Высота волны[б], мм	$u_{meth} \cdot 10^3$, $см^2/В \cdot с$ [в]	Высота волны[б] мм
OH^-	204,6	—	54,8	158
Br^-	81,3	105	58,6	153
I^-	79,8	106	66,1	138
Cl^-	79,0	107	54,1	164
NO_3^-	74,0	111	63,9	148
F^-	56,5	134	42,2	196
$HCOO^-$	56,6	136,5	51,7	176
CH_3COO^-	42,6	162	40,8	191
H^+	362,2	34	149,7	94
Ca^{2+}	81,3	132	62,5	163
Rb^+	80,3	131	58,4	174
NH_4^+	76,9	138	58,7	170
K^+	76,7	138	54,4	181
Na^+	52,8	182	46,8	206
Li^+	40,2	220	40,4	236

[а] u_{H_2O} — расчетная электрофоретическая подвижность в водной среде.
[б] Определена с помощью термического детектирования.
[в] u_{meth} — расчетная электрофоретическая подвижность в метаноле.

ке в условиях капиллярного ИТФ, длина зоны, вдоль которой высота сигнала остается постоянной, служит мерой общего количества иона. Очень полезным в этом случае оказался простой метод калибровочных коэффициентов. Величина $D_{X,R}$ для данного компонента X определяется как отношение длины волны компонента X в расчете на моль L_X/n_X к аналогичному значению L_R/n_R, полученному для подходящего стандартного вещества R, которое анализируется одновременно с компонентом X и в тех же условиях

$$D_{X,R} = (L_X/n_X)/(L_R/n_R), \quad (12.15)$$

где n — молярная концентрация. Значение $D_{X,R}$ зависит от состава ведущего электролита и температуры, но не зависит от геометрии системы, значения электрического тока или гидродинамического противотока. Соотношение L_R/n_R постоянно для

всех компонентов, разделяемых одновременно с компонентом R, поэтому

$$L_X = Cn_X D_{X,R}, \tag{12.16}$$

где C — «постоянная» прибора, а n_X — число молей компонента X.

В этих же целях можно воспользоваться методом внутреннего стандарта. К известному объему V_X образца, содержащего компонент X в неизвестной концентрации m_X добавляют известный объем V_S раствора стандартного вещества S (концентрация m_S). В процессе изотахофореза условного объема этой смеси измеряются длины волн L_X и L_S. Используя полученные величины, можно с помощью приведенного ниже выражения рассчитать величину m_X.

$$m_X = (V_S L_X D_{S,R} / V_X L_S D_{X,R})\, m_S. \tag{12.17}$$

12.3.3. ПРЕПАРАТИВНЫЙ ИЗОТАХОФОРЕЗ

Как препаративный метод изотахофорез обладает совершенно исключительной особенностью, а именно: разрешающая способность метода не уменьшается с увеличением количества об-

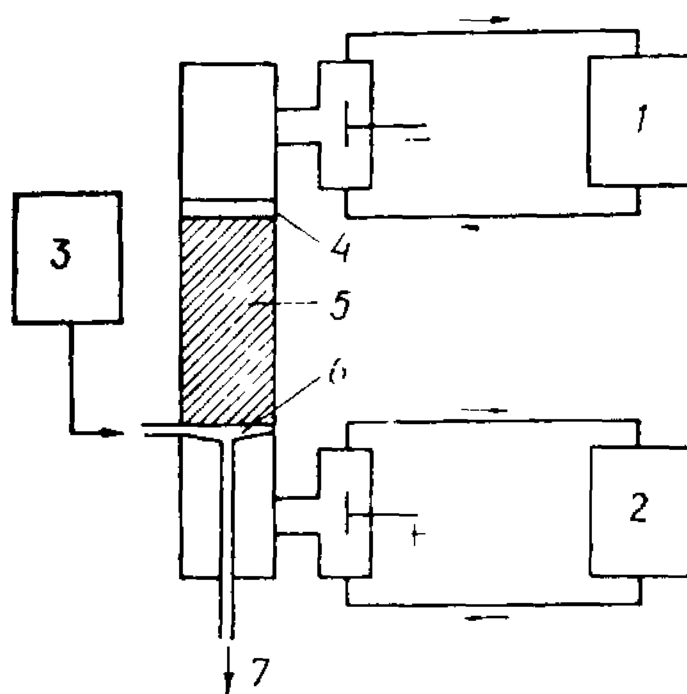


Рис. 12.14. Схема прибора для препаративного гель-изотахофореза с постоянным элюированием [17].

1, 2 — насосы для циркуляции электродных электролитов; *3* — резервуар для элюента и насос; *4* — слой, содержащий образец; *5* — полиакриламидный гель; *6* — ячейка для элюирования; *7* — вывод элюента в коллектор фракций.

разца. Даже при большом количестве образца можно получить хорошее отделение минорных фракций. Все общепринятые методики предполагают использование тонкого слоя полиакриламидного геля, не проявляющего молекулярно-ситовых свойств (рис. 12.14). При изотахофорезе высокомолекулярных соединений обычно образуются зоны с высокой концентрацией, поэтому

их обнаружение осуществить легче, чем в аналогичном зонном электрофорезе в геле.

Наиболее трудных разделений последовательных зон с низким содержанием образца удается избежать путем добавления прокладочных соединений, в основном амфотерных [амфолин, фирмы LKB (Бромма, Швеция)], в подходящем узком диапазоне изоэлектрических точек. Свендсен [93] продемонстрировал возможность этого метода на примере разделения компонентов гемоглобина человека (см. рис. 12.31).

Для макроразделений предпочтителен метод непрерывного изотахофореза без носителя, когда электрическое поле приложено перпендикулярно выбранному направлению потока электролита. С помощью этого метода Притц [77а] разделил некоторые комплексы иридия, а Прусик [79] — компоненты концентрата амилазы.

12.4. ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ (ФОКУСИРОВАНИЕ)

12.4.1. ТЕОРИЯ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ

В изоэлектрическом фракционировании, или фокусировании, (сокращенно ИФ) используется градиент концентрации ионов, который влияет на заряд разделяемых компонентов, например H^+ и комплексообразующих ионов. Самый обычный пример — ИФ амфотерных макромолекул, главным образом белков при градиентном изменении pH. Белки значительно различаются по своим изоэлектрическим точкам, т. е. по значениям pH, при которых они имеют нулевой заряд. При pH меньшем, чем изоэлектрическая точка, белок приобретает положительный заряд, и поэтому движется в электрическом поле как катион. При наличии градиента pH, который увеличивается от анода к катоду, ион движется к точке, у которой он потеряет свой положительный заряд или станет полностью электрически нейтральным. Такой градиент pH можно создать с помощью системы буферных растворов. Однако описанный метод не нашел широкого применения. Свенсон [95] теоретически обосновал и подтвердил практически преимущества применения устойчивого естественного градиента pH. Градиент такого типа наблюдается при электролизе смеси амфотерных веществ. Стационарное состояние устанавливается в том случае, когда амфолиты располагаются в порядке увеличения изоэлектрической точки *pI* от самого низкого значения (вблизи анода) до самого высокого (вблизи катода). Практическое использование этого метода возможно при подборе подходящей смеси амфолитов-носителей. Амфолиты долж-

ны отвечать следующим требованиям: 1) отсутствие взаимодействия с белками, 2) низкая молекулярная масса, 3) наименьшее возможное различие между р*K* и *pI*, 4) хорошая электропроводность, 5) наименьшее возможное поглощение света в области УФ-поглощения белков, 6) равномерное распределение зон р*I* амфолитов, 7) максимальное количество различных значений р*I*. Сначала в качестве амфолитов использовались лишь вещества, химически близкие белкам, т. е. различные типы частично расщепленных белков: гидролизаты гемоглобина, обессоленные препараты пептона или, что более удобно, гидролизаты казеина и лактальбумина. Эти смеси можно применять в тех случаях, когда определению не мешает их пептидная природа. Когда требуется более тонкое изменение р*I* и более близкий к линейному градиент, следует применять электролиты-носители, предложенные Вестербергом [103]. Это гетерогенные синтетические материалы, выпускаемые фирмой LKB под названием амфолиновые электролиты («Ampholine electrolyte»), с известным диапазоном *pI*. Амфолиновые электролиты представляют собой смесь алифатических полиаминополикарбоновых соединений с молекулярной массой 300—1000 и р*I* от 3 до 10; диапазон р*I* может быть и более узким.

Миграция амфотерных соединений в условиях ИФ до такого положения, в котором молекула имеет нулевой суммарный заряд, конкурирует с тенденцией зон расширяться вследствие диффузии. Увеличение градиента напряжения усиливает фокусирующий эффект до тех пор, пока джоулево тепло не вызывает смешения зон под действием тепловой диффузии и конвекции или не приведет к денатурации природных амфотерных макромолекул. Теория этого процесса была разработана Свенсоном [96]. И буферная емкость, и необходимая электропроводность амфолитов увеличиваются по мере уменьшения разности между р*I* и р*K*. Когда эта разность становится равной единице, сохраняется 25% максимальной буферной емкости, но при разности, близкой к 2, остается только 3% буферной емкости. Величина разности в 1,5—2 ед. рН является пределом, до которого амфолиты используются в качестве среды для изоэлектрического фракционирования.

12.4.2. ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ В ЖИДКОЙ СРЕДЕ

Изоэлектрическое фракционирование можно проводить в такой среде, в которой осаждению зон макромолекул препятствует резкий градиент плотности среды. Большее число фракций можно получить просто за счет вытекания их из прибора. Другое преимущество метода — возможность точного измерения гра-

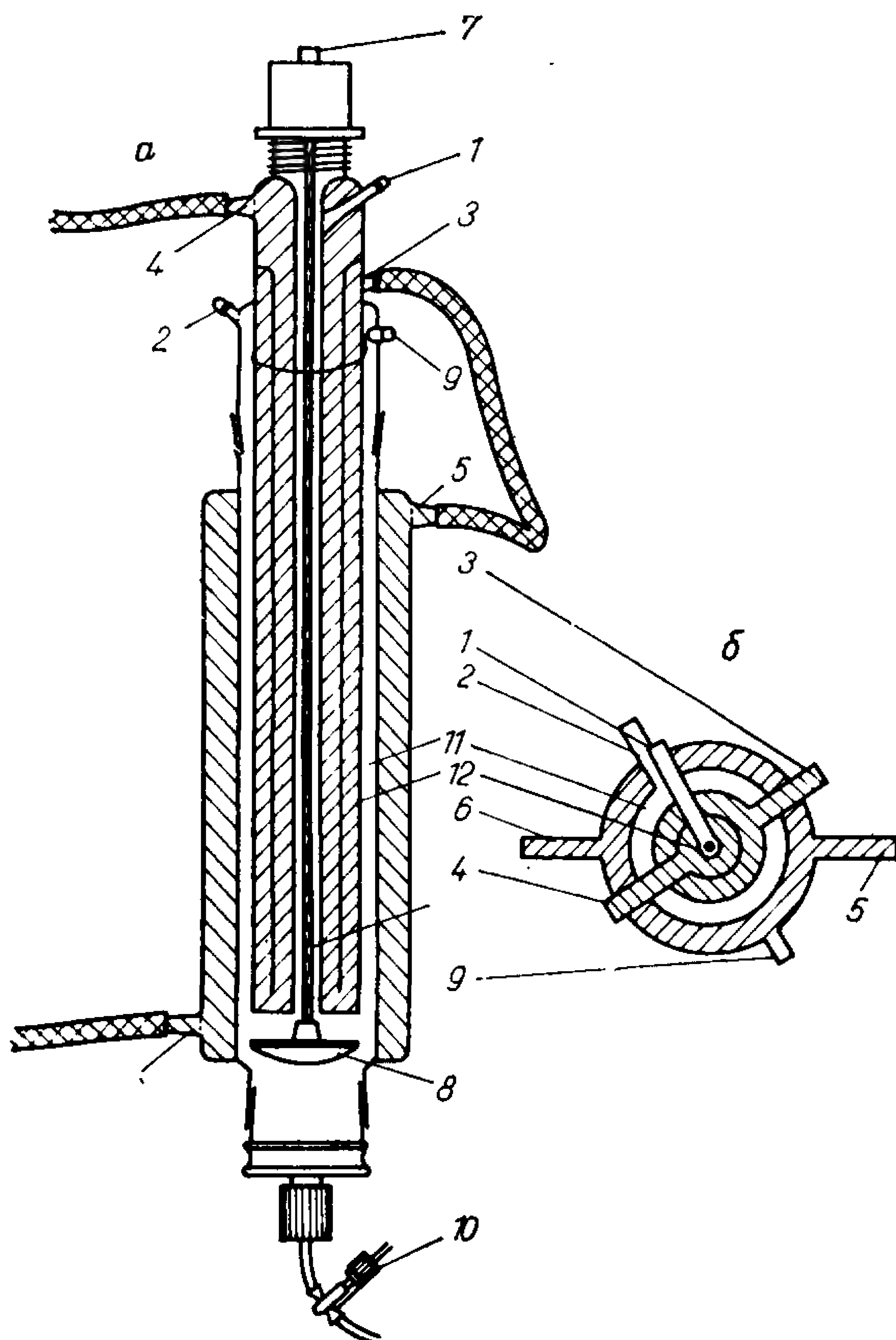


Рис. 12.15. Схема прибора (фирма LKB) для изоэлектрического фокусирования со стабилизацией зон при градиенте плотности.

а — продольный разрез; *б* — поперечный разрез; *1*, *2* — ввод электродных растворов; *3* — ввод охлаждающего раствора прибора; *4* — вывод охлаждающего раствора прибора; *5* — вывод охлаждающего раствора из внешней части прибора; *6* — ввод охлаждающего раствора из внешней части прибора; *7* — ввод продукта к центральному электроду и затвор внутренней части электрода; *8* — затвор пространства внутреннего электрода, соединенный с тефлоновым стержнем, вокруг которого намотана платиновая проволока, служащая внутренним электродом; *9* — контакт, соединенный с внешним электродом платиновой проволокой; *10* — затвор выводного отверстия для фракций, который используется также для непрерывного заполнения аппарата электролитом-носителем из градиентного смесителя; *11* — пространство для разделения при градиенте плотности; *12* — емкость для центрального электродного раствора (с разрешения фирмы LKB Produkter, Бромма, Швеция).

диента pH во фракциях и возможность непрерывного измерения УФ-поглощения при использовании проточной кюветы. Емкость применяемых колонок составляет около 10 мг образца. Для создания градиента плотности удобно пользоваться сахарозой. Емкость типичного прибора, выпускаемого фирмой LKB, составляет 110 мл для аналитического и 440 мл для полупре-

Таблица 12.11

Напряжения, рекомендуемые для изоэлектрического фокусирования [37]

pH	Напряжение на старте, В	Ток, мА	Продолжительность эксперимента, сут
3—10	300	0,30	2—3
3—5	450	2,45	1—2
5—7	600	0,40	1—2
7—9	600	0,50	4
7—10	400	0,65	5—6

[a]Разделение проводилось на колонке объемом 110 мл, заполненной амфолином (LKB-Produkter, Бромма 1, Швеция), при 10 °С; для получения градиента плотности применялась сахароза.

паративного разделения белков. Чтобы уменьшить влияние выделяющегося тепла, применяют стеклянные приборы, имеющие форму коаксиальных цилиндров, с центральным и периферическим охлаждением. Процесс ИФ протекает в кольцевом зазоре. Вверху зазора располагается электрод, а внизу — механический затвор и выход. Разделение ведется при открытом механическом затворе, так что кольцевой зазор в это время гидравлически и электрически связан с центральной трубкой, в которой помещается второй электрод. Схема конструкции прибора LKB 8100-10 представлена на рис. 12.15. В приборах колоночного типа процесс изоэлектрического фракционирования продолжается от 24 до 72 ч в зависимости от диапазона значений р*I* амфолитов-носителей. Чем выше разрешающая способность, тем медленнее наступает стационарное состояние, так как небольшое различие между pH среды и р*I* фокусируемого белка, свидетельствующее о низком заряде макромолекулы, обусловливает медленное перемещение в положение, где р*I*=pH. В установку для ИФ колоночного типа входят: 1) перистальтический насос со скоростью подачи 1—5 мл/мин; 2) рН-метр с точностью ±0,01 pH; 3) источник напряжения, допускающий напряжение до 1200 В — 20 Вт (лучше со стабилизацией выхода или тока); 4) коллектор фракций; 5) УФ-спектрофотометр с проточной ячейкой для измерения поглощения при 280 или 210 нм и самописец. Если прибор используется часто, необходим градиентный смеситель для получения непрерывного градиента. Если необходимо выделять фракции, комплект образования должен включать прибор для гель-хроматографии. Для термостатирования можно применять криостат с насосом для подачи охлаждающей смеси, особенно это необходимо, если работа ведется при темпе-

ратуре около 0 °С. Для точного измерения р*I* обязательно термостатирование фракций. В табл. 12.11 приводятся рекомендуемые значения напряжения для различных интервалов градиен-

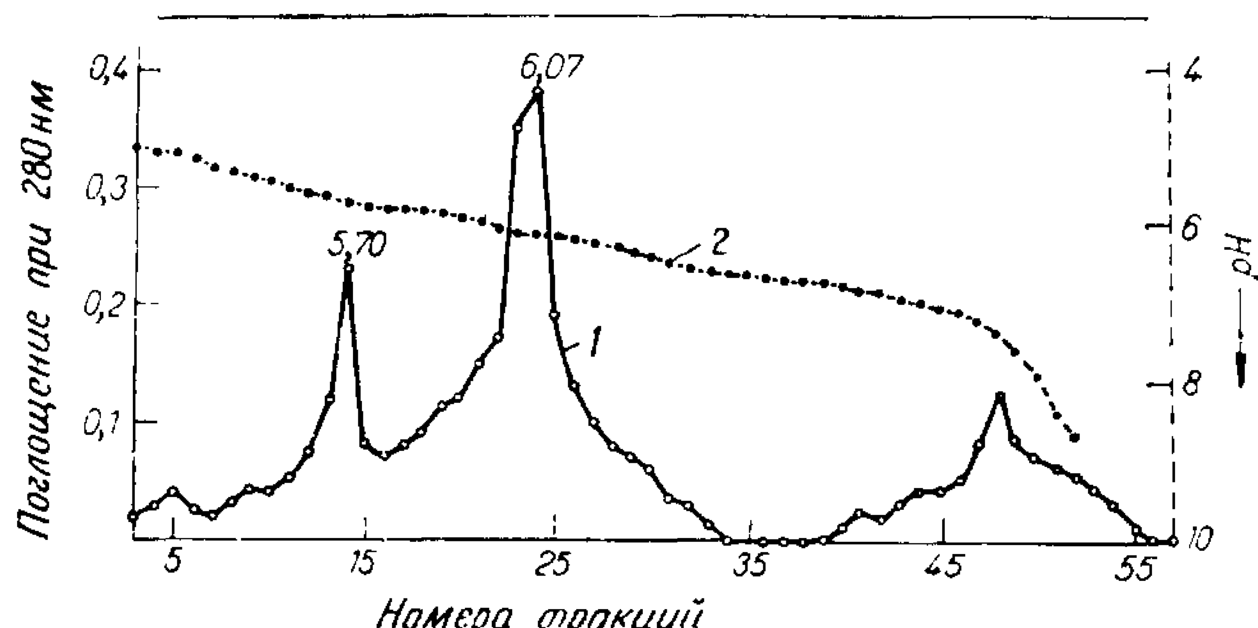


Рис. 12.16. Выделение компонентов бычьего α-кристаллина методом изоэлектрического фракционирования при градиенте плотности [5].

Аппарат фирмы LKB объемом 110 мл [104]; линейный градиент концентрации сахарозы в 1%-ном растворе амфолина LKB, pH 5—8 в присутствии 6 М мочевины; образец — 25 мг обессоленного препарата в 56 мл раствора, не содержащего сахарозы; условия разделения: 2 ч при 500 В и 48 ч при 800 В; начальный ток 2,8 мА, конечный — 1,8 мА; температура —20 °С, объем отбираемых фракций — примерно 30 капель. *1* — изоэлектрические точки фракций с максимумом поглощения при 280 нм; *2* — градиент pH.

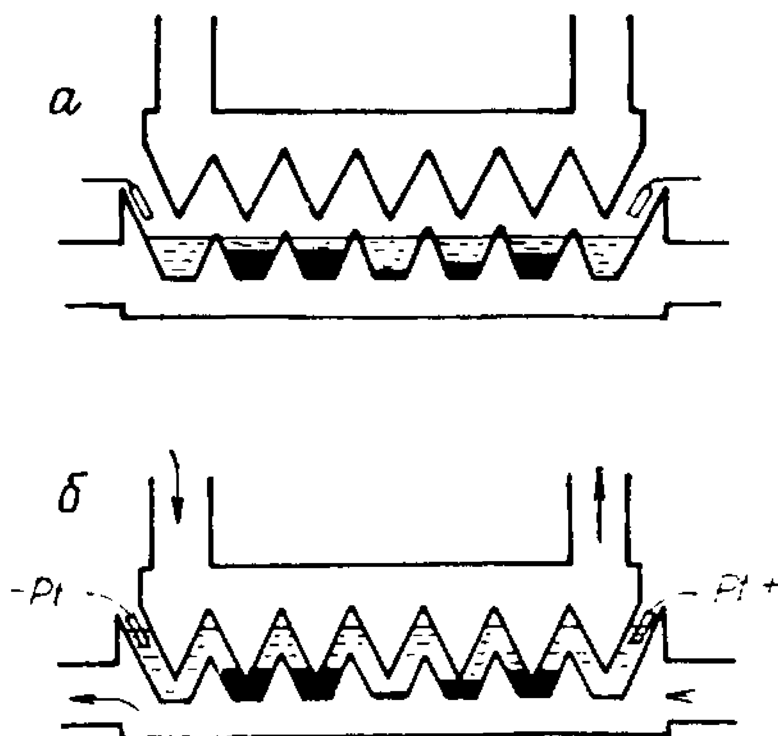


Рис. 12.17. Аппарат для препаративного изоэлектрического фракционирования с охлаждением [102].

а — аппарат со снятой верхней частью — состояние до и после разделения; *б* — собранный аппарат с закрытым и соединенным гидравлически и электрически сосудом с коническими углублениями; темные участки — это раствор, содержащий фракции белка, осадок изображен на дне центрального сегмента сосуда. Стрелки указывают направление потока охлаждающего раствора.

та pH на колонке объемом 110 мл (фирма LKB) при концентрации амфолина 1%. Для заполнения электродных камер применяются электролитные разбавленные кислоты, например для заполнения анодной камеры 1—5%-ная H_3PO_4, а для заполнения катодной камеры — разбавленные основания, например этилен-

диамин такой же концентрации. Для создания градиента плотности во всем диапазоне pH, вплоть до pH 10, можно использовать сахарозу. При более высоких pH градиент может быть образован с помощью этиленгликоля или глицерина. На рис. 12.16 показано разделение α-кристаллина. Недостаток метода — низкая растворимость некоторых белков при значениях pH, близких или равных их p*I*. Растворимость можно до некоторой степени увеличить, добавляя амфолин до концентрации выше 1%. В ряде случаев, чтобы избежать осаждения белков, изоэлектрическое фракционирование ведут в геле. В предложенной Вальметом [102] методике решены и проблема осаждения, и проблема сбора фракций. Градиент плотности в этом случае необязателен, а емкость прибора, если необходимо, можно увеличить, увеличивая размеры охлаждаемого сосуда с конусными углублениями. Принцип метода иллюстрирует рис. 12.17. Осаждающиеся белки остаются на дне отдельных сегментов, где белки располагаются в соответствии с их p*I*.

12.4.3. ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Изоэлектрическое фокусирование в геле имеет определенные преимущества по сравнению с ИФ в среде со стабилизованным градиентом плотности. Эти преимущества состоят в следующем: 1) сокращается длительность разделения; 2) полностью подавляется термическая конвекция; 3) применяется простое оборудование для ИФ; 4) возможно одновременное разделение нескольких образцов; 5) возможно обнаружение с помощью различных красителей и различных методик; 6) возможно объединение ИФ и зонного электрофореза в двухмерном варианте; 7) достаточно небольшого количества образца; 8) возможно обнаружение белков методом иммунодиффузии. Однако при применении геля возникают проблемы, связанные с молекулярно-ситовым эффектом, который имеет место в основном при разделении больших молекул. Другой недостаток метода — это низкая точность определения pH в зонах. В настоящее время этот метод (сокращенное обозначение ИФПАА или ПАГИФ) является общепринятым и широко используется. В отдельных случаях, согласно данным [73], при проведении дискретного трубчатого электрофореза в полиакриламидном геле допускается окрашивание. Для снижения молекулярно-ситового эффекта рекомендуется [23] концентрация геля 3,7%. Типичный градиент напряжения для 8-часового разделения составляет 200 В на 60 мм. Если тепло отводится, то напряжение можно увеличить и соответственно сократить длительность разделения. Градиент pH можно измерить после разрезания столбиков с гелем и последующего элюирования сегментов небольшим коли-

чеством воды. Кроме того, pH можно измерить непосредственно в геле с помощью стеклянных микроэлектродов. Профиль концентрации в гелях можно непосредственно определить с помощью регистрирующего спектрофотометра. Методы, в которых используются плоские слои гелей, пригодны для сравнения нескольких образцов.

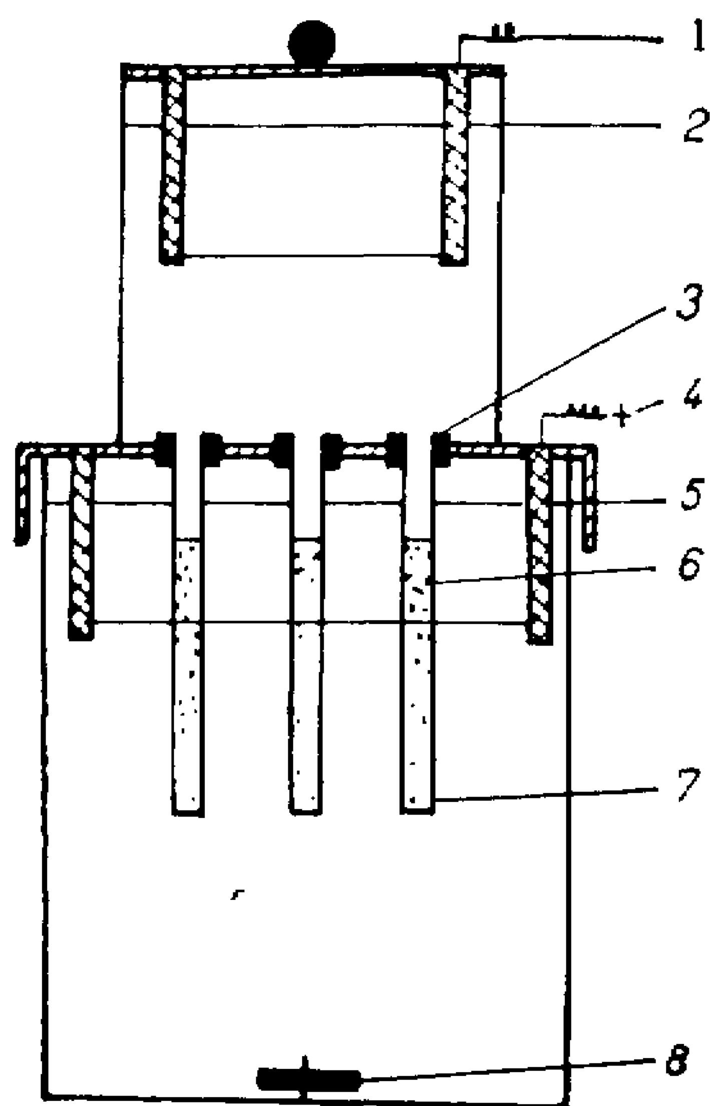


Рис. 12.18. Схема прибора фирмы Shandon для дискретного электрофореза в полиакриламидном геле.

1 — катод; *2* — уровень буферного раствора; *3* — резиновая прокладка; *4* — анод; *5* — уровень буферного раствора; *6* — полиакриламидный гель; *7* — стеклянная трубка; *8* — магнитная мешалка. Полярность электродов может быть обратной. Благодаря возможности охлаждения аппарат можно также использовать для изоэлектрического фокусирования в полиакриламидном геле.

На рис. 12.18 показана схема основного прибора для ИФ, проводимого в трубках. Способ получения геля и методика разделения описываются в разд. 12.7.

12.5. ИСТОЧНИКИ ПИТАНИЯ

Для электрического питания электрофоретических приборов обычно применяют различные нестабилизованные источники питания, напряжение в которых выбирается в соответствии с возможностью отвода тепла из прибора. Пульсирующие источники постоянного тока дают такое же хорошее разделение, как и источники обычных типов с RC- или LC-выпрямителем. Эти источники наиболее безопасны, так как напряжение в них после выключения питания сразу же падает до нуля. Вследствие более высокого максимального напряжения пульсирующего источника прибор должен быть настроен на необходимое напряжение. Для более точного и безопасного контроля разделений можно использовать источник стабилизованного тока (проточный электрофорез, зональный электрофорез с носителем, гель-электрофо-

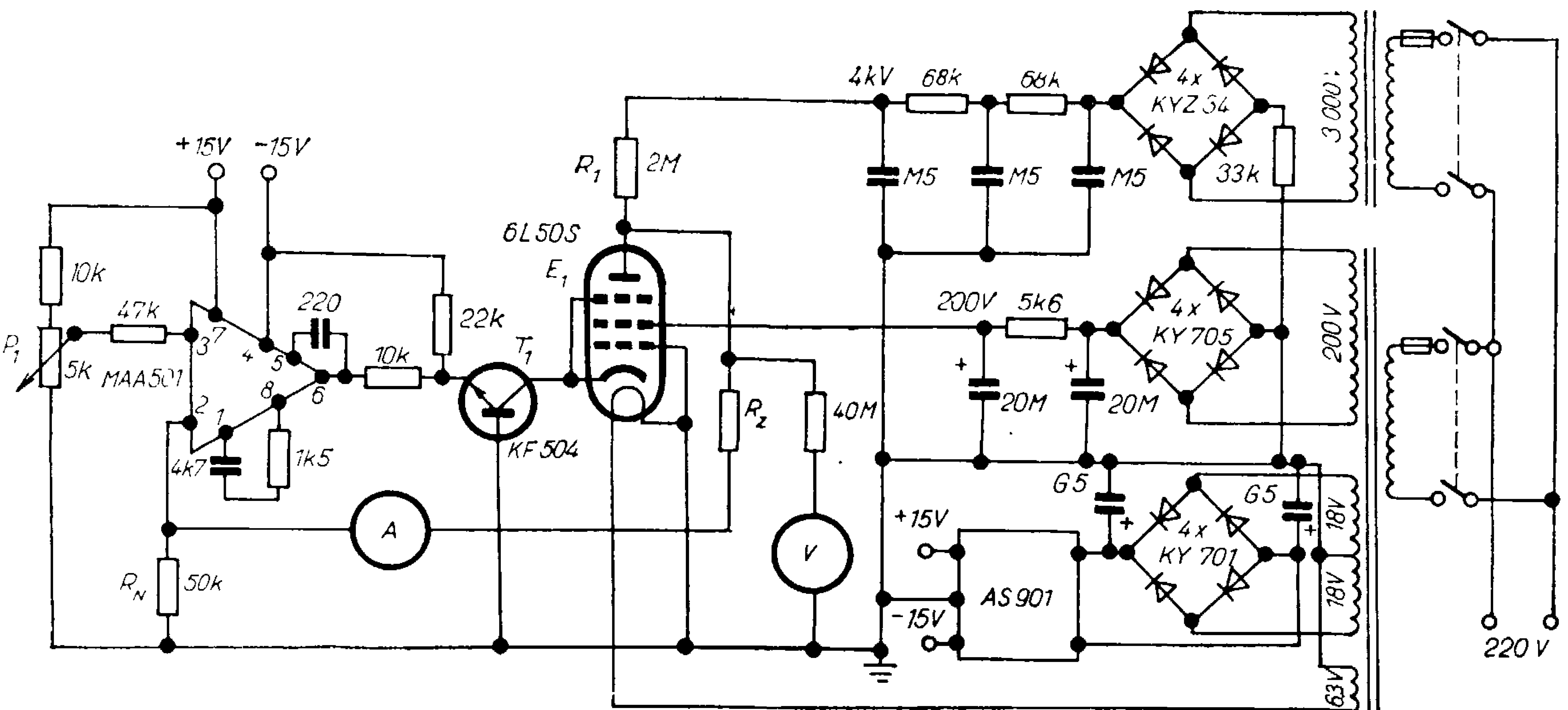


Рис. 12.19. Источник стабилизованного тока для капиллярного противоточного изотахофореза [101].

Источник дает 100 мкА при 4,5 кВ; сопротивление R — капиллярная система аппарата; значение стабилизованного тока устанавливается на потенциометре P_1; детали, использованные в схеме, выпускает фирма Tesla (ЧССР). AS 901 — источник стабилизованного тока (+15 В) той же фирмы. Чтобы повысить напряжение до 20 кВ, электронную лампу 60L50S заменяют на лампу типа 7234 фирмы Victoreen (США) и одновременно увеличивают напряжение высоковольтного трансформатора. Более высокое напряжение необходимо для изотахофореза медленно движущихся ионов, например белков.

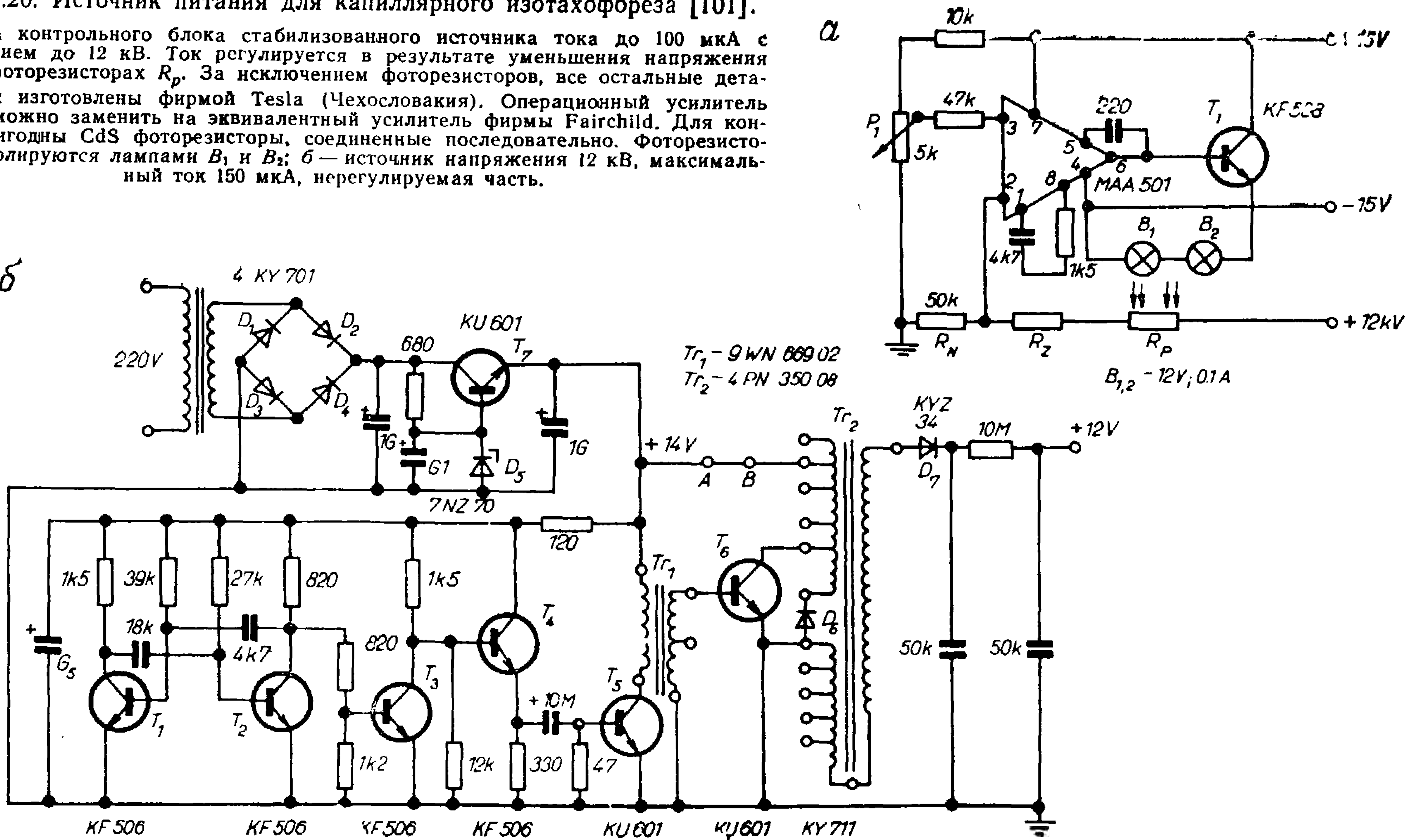


Рис. 12.20. Источник питания для капиллярного изотахофореза [101].

а — схема контрольного блока стабилизованного источника тока до 100 мкА с напряжением до 12 кВ. Ток регулируется в результате уменьшения напряжения на CdS фоторезисторах R_p. За исключением фоторезисторов, все остальные детали схемы изготовлены фирмой Tesla (Чехословакия). Операционный усилитель MAA 01 можно заменить на эквивалентный усилитель фирмы Fairchild. Для контроля пригодны CdS фоторезисторы, соединенные последовательно. Фоторезисторы контролируются лампами B_1 и B_2; *б* — источник напряжения 12 кВ, максимальный ток 150 мкА, нерегулируемая часть.

рез в полиакриламидном геле), а также стабилизацию тока, которая является совершенно необходимой для количественного капиллярного изотахофореза. Очень хорошее разделение получается с помощью новых стабилизованных источников питания [44], дающих максимальный градиент напряжения, согласующийся с максимально допустимой скоростью нагревания. Эти источники позволяют максимально использовать аппарат без риска перегрева носителя. Электрические схемы источников тока для капиллярного изотахофореза изображены на рис. 12.19 и 12.20. Для обесцвечивания гелей используется тот же источник питания, что и для электрофореза, а для быстрого обесцвечивания напряжение прикладывают перпендикулярно болеее длинной оси геля с помощью источника нестабилизованного постоянного тока около 0,5 А и напряжением до 50 В.

12.6. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

Электрофоретическое оборудование обычно работает во влажной атмосфере, причем величины напряжения и силы тока, как правило, превышают безопасные пределы. Неправильное обращение с приборами уже привело к нескольким несчастным случаям со смертельным исходом. Омическое сопротивление человеческого тела, обычно составляющее 10^3—10^4 Ом, существенно зависит от физиологического состояния человека и влажности кожи. Для человека опасен даже ток силой 10 мА, так как при поражении током пострадавший обычно не может сам отсоединиться от проводника. Ток силой более 25 мА вызывает серьезные повреждения в организме — остановку сердца, паралич дыхательных мышц, ожоги и т. д., которые могут привести к смерти. Учитывая, что сопротивление тела 10^3 Ом, напряжение всего лишь в 100 В способно привести к несчастному случаю; в результате уменьшения сопротивления вследствие шока, сопровождающегося потоотделением и (или) повреждением кожи, опасно даже меньшее напряжение. Таким образом, приборы для электрофореза и изоэлектрического фокусирования, являющиеся источниками электрического тока, могут представлять опасность для жизни. Если источники питания стабилизованы, то опасность возрастает, так как напряжение во время разъединения проводов или разрыва проводящих соединений в электрофоретической камере увеличивается. При работе на приборе для дискретного электрофореза в полиакриламидном геле, который обычно снабжен стабилизованным источником питания, риск часто недооценивают.

По этим причинам следует учитывать следующие рекомендации:

1. Источник питания во время работы с электродными сосудами должен быть отключен.

2. Прежде чем проводить какие-либо операции, следует проверить, установлен ли на нуль источник тока и напряжения. Не следует недооценивать остаточный заряд на конденсаторе выпрямителя постоянного напряжения.

3. Следует проверить состояние кабелей, соединителей и водонепроницаемость электрофоретической камеры и электродных сосудов. Прежде чем подсоединить источник питания, следует исключить возможность попадания влаги в аппарат.

4. Предпочтение следует отдавать приборам, имеющим защитные схемы для блокирования высокого напряжения во время работы. Обычно применяют защитные приспособления с блокирующими и закорачивающими соединениями. Металлические блоки заземляют (см. например, рис. 12.24, где изображено защитное приспособление «Savant High Voltage Enclosure», производится фирмой Savant (США).

12.7. ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

12.7.1. ЗОННЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ИОНОВ В ЛИГАНДНЫХ БУФЕРНЫХ РАСТВОРАХ

Неорганические вещества часто имеют близкие электрофоретические свойства, поэтому их разделение в обычных электролитах не дает хороших результатов. Однако образование ионных комплексов часто приводит к изменению электрофоретических свойств центральных ионов, что позволяет провести их разделение. Так, например, согласно данным Джокла [45] и Джокла, Андейча и Майера [47], путем правильного подбора лиганда и pH методом зонного электрофореза в лигандном буферном растворе удалось разделить такие близкие ионы, как катионы редкоземельных элементов. Примеры разделения в лигандных буферных растворах и составы этих растворов приведены в табл. 12.12 и на рис. 12.21. Применяемые лиганды — это анионы неорганических и органических кислот. Простейшим комплексообразующим агентом является HCl, дающая целый ряд подходящих хлоро-комплексов, например хлоро-комплексы Hg(II), Pd(II), Pt(IV), Au(III), Bi(III), Sb(III), Cd(II), Cu(II). Hg, Bi, Cd, Pd и Cu можно разделить в 1—5 *М* HCl [59]. Уксусную кислоту можно использовать для отделения урана от сопутствующих элементов. Щавелевая кислота применяется для разделения Th, U и Pa, а гликолевая — разделения лантанидов, Th, U, Zr, обычных катионов и редкоземельных элементов. Дикарбоновые и замещенные карбоновые кислоты, способные образовывать

хелаты, в особенности аминокислоты и оксикислоты типа комплексонов, как было найдено, пригодны для целого ряда разделений. Вероятно, наиболее универсальными компонентами основ-

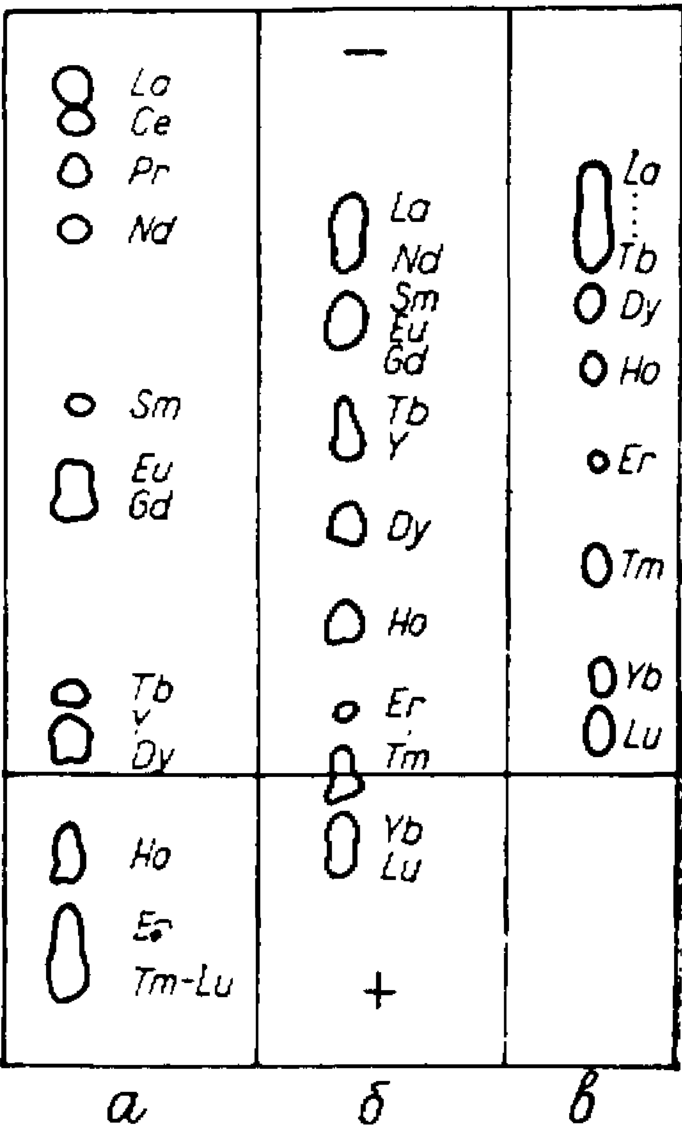


Рис. 12.21. Зонный электрофорез редкоземельных элементов в Zn-ЭДТА лигандных буферных растворах [46].

Использовались три типа основных электролитов *А*, *Б*, *В*, которые отличались концентрацией лиганда. Составы буферов *а*, *б* и *в* приведены в табл. 12.12. Бумага ватман № 2, аппарат с охлаждаемой пластиной OE 205 фирмы Labor MIM (Будапешт), температура 20 °С. Градиент напряжения 30 В/см. Время разделения 90 мин. Для одного разделения используют 10 мкл образца с 0,01 н. концентрацией каждого компонента. Детектирование: электрофореграмма протягивается через насыщенный спиртовой раствор ализарина 0,1 М по HCl и высушивается в атмосфере аммиака.

ных электролитов являются оксикислоты. α-Оксимасляная кислота применяется при электрофорезе редкоземельных элементов на ацетатцеллюлозной пленке [10]. В присутствии этой кислоты на бумаге и в тонких слоях наряду с лантанидами удалось также разделить актиниды [1]. Большие различия в под-

Таблица 12.12

Лигандные буферные растворы для электрофоретического разделения редкоземельных элементов[а]

pL[б]	Объем раствора I, мл	Объем раствора II, мл	Обнаружение[в]
17,5	10	10	*а*
18,1	10	25	*б*
18,5	10	50	*в*

Основной электролит, состоящий из растворов I+II, доводят до pH 2,0 1 н. HNO_3 и затем доливают воду до 100 мл. Раствор I — 0,1 М Na_2EDTA; раствор II — 0,2 М $Zn(NO_3)_2$.

[а] Согласно данным Джокла и Пикуликовой [46] и Джокла и Валашковой [47а].

[б] pL=—log[L].

[в] См. рис. 12.21.

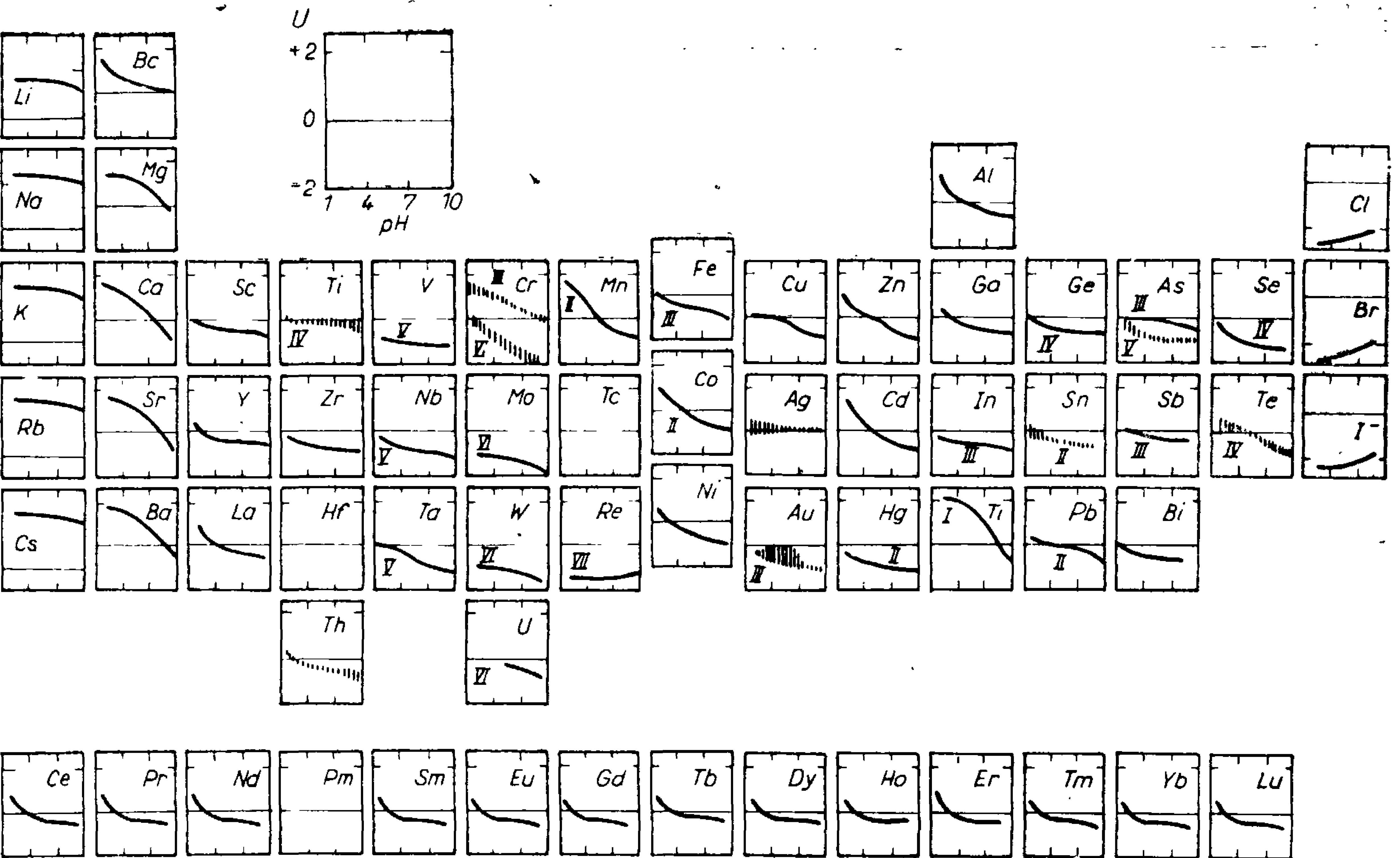


Рис. 12.22. **Зависимость относительной электрофоретической подвижности от** pH лигандных буферных растворов [47].

По ординате отложена относительная подвижность *u* (подвижность тетраметиламмония принята за единицу), по абсциссе pH. **Бумага ватман № 1, основной электролит 0,05 М оксиэтилиминодиуксусная кислота, градиент напряжения 15 В/см, температура 20 °С, время разделения 90 мин.**

вижности получены в разбавленной лимонной кислоте, которая в кислой среде образует стабильные анионные хелаты. Наряду с этим она пригодна и в широком буферном диапазоне, например для разделения обычных катионов, редкоземельных элементов, продуктов расщепления урана или тяжелых металлов при анализе золы растений [49]. Для непрерывного электрофореза катионов предложен буфер, содержащий яблочную кислоту [68]. Аминокислоты или пептиды образуют с двухвалентной медью очень устойчивые и легко обнаруживаемые комплексы [11]. Основной электролит, содержащий этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), в нейтральной среде пригоден для разделения катионов щелочноземельных металлов, которые образуют анионные комплексы [19]. В ЭДТА в щелочной среде удается разделить все шесть металлов платиновой группы. Аналитическая группа цинка может быть разделена в растворе KCN [61]. Металлы платиновой группы и щелочноземельные металлы также разделяют в растворе хлорида аммония. Редкоземельные элементы лучше всего разделять в среде, содержащей оксикислоты, например молочную, винную и лимонную. Группы Dy—Y, Eu—Ce, Pr—Sc—Sm, Ce—Y—La, Yb—Dy и La—Nd—Sm были разделены в 1%-ной лимонной кислоте [58]. Продукты радиоактивного распада урана разделяют в среде винной кислоты при pH 2,6—3. На рис. 12.22 приведены подвижности катионов в 0,05 *М* оксиэтилиминодиуксусной кислоте в зависимости от pH.

12.7.2. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ

Бумажный электрофорез является простейшим методом разделения аминокислот и олигопептидов с молекулярной массой до 2000—4000. При низких градиентах потенциала хорошие результаты дает нисходящий электрофорез (до 1500 В) при pH 5,6,

Таблица 12.13

Пиридинацетатные буферные растворы для электрофореза на бумаге[a] при pH 3,5—6,5 (по данным Сарджента [86]

Пиридин, мл	Уксусная кислота мл	Вода, мл	pH
20	200	1780	3,5
20	10	2470	4,4
200	80	1720	5,3
250	10	2250	6,5

[a]Буферные растворы летучи, и поэтому после высушивания обнаружение может проводиться без ограничений.

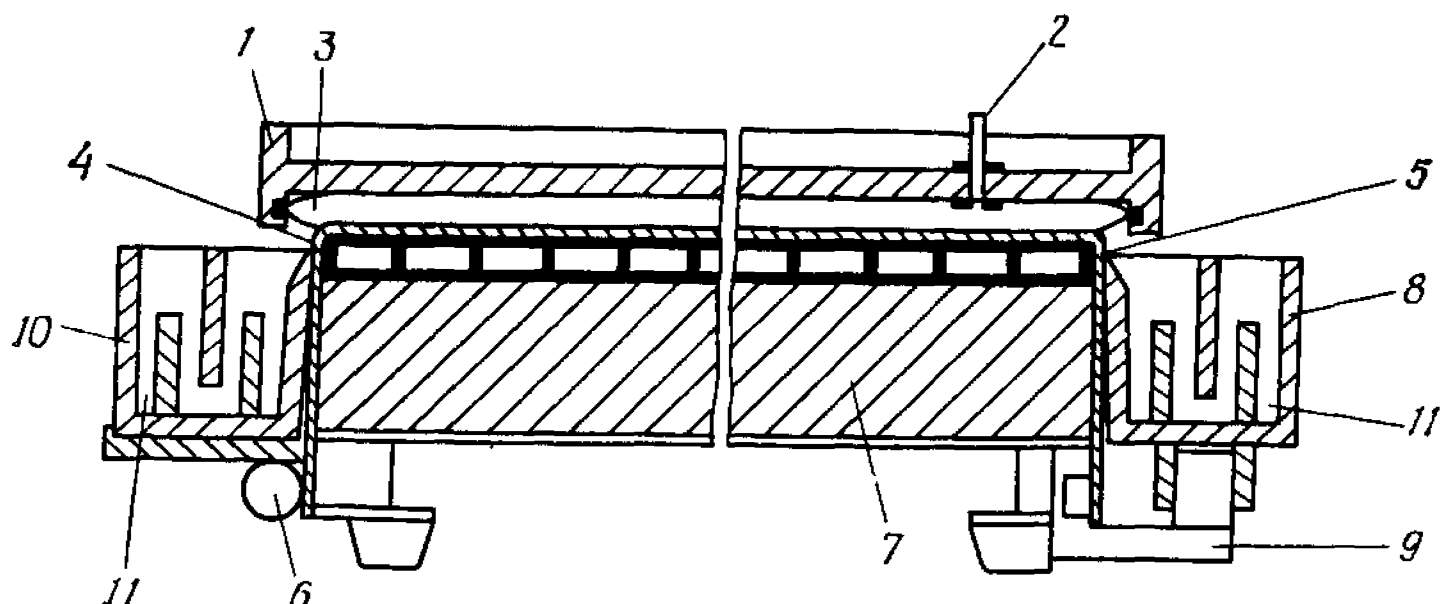


Рис. 12.23. Продольный разрез прибора для высоковольтного бумажного электрофореза с твердым теплообменником [82].

1 — крышка; *2* — ввод для сжатого воздуха или подключение к вакууму; *3* — полиэтиленовый мешок; *4* — полиэтиленовая изолирующая пленка; *5* — система охлаждения с медной пластиной; *6* — приспособление для протягивания пленки; *7* — теплоизоляция; *8* — электродная камера с высоким напряжением относительно Земли; *9* — изолирующая стойка для электродной камеры; *10* — электродная камера с низким напряжением относительно Земли; *11* — Pt проволочные электроды.

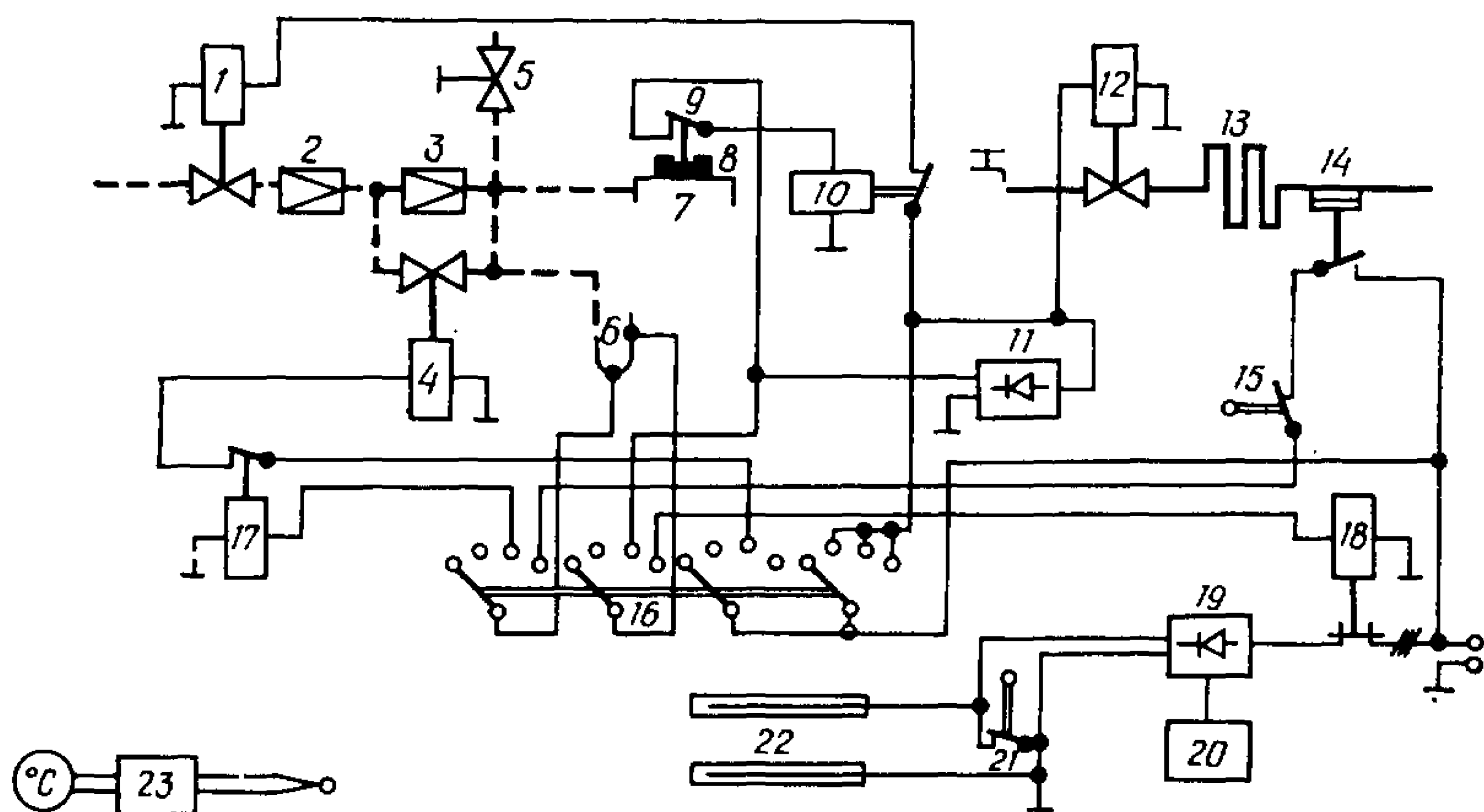


Рис. 12.24. Схема соединений высоковольтного охлаждаемого электрофореза на носителе с блокирующей цепью, увеличивающей безопасность работы [82].

1 — электромагнитный впускной клапан для воздуха; *2* — клапан, снижающий давление воздуха, 0,1 кПа/см²; *3* — клапан, снижающий давление воздуха, 0,05 кПа/см²; *4* — электромагнитный клапан для быстрого заполнения полиэтиленового мешка, ручной воздушный клапан, контактный ртутный манометр на 0—50 мм рт. ст.; *5* — полиэтиленовый мешок; *6* — постоянный магнит, установленный на крышке; *7* — контакт реле, управляемый магнитом *8*, для контроля закрывания крышки; *8* — электромагнитное реле; *9* — источник постоянного тока (24 В); *10* — регулируемый водой электромагнитный соленоидный клапан; *11* — система охлаждения прибора; *12* — жидкостный контактный термостат; *13* — микровыключатель заземленной защитной крышки; *14* — переключатель операций; *15* — электромагнитное реле для быстрого заполнения полиэтиленового мешка; *16* — высоковольтный контактор; *17* — источник высокого напряжения; *18* — контрольная схема высокого напряжения; *19* — закорачивающий переключатель высоковольтной схемы; *20* — электродные камеры; *21* — контрольный термистор, термометр для измерения температур электрофоретического носителя.

описанный в разд. 12.2.3 (см. рис. 12.4). Он пригоден для фракционирования ряда кислотных и основных аминокислот и пептидов. Нейтральные аминокислоты и пептиды с помощью этого метода не разделяются, но их можно разделить в протонированной форме в кислой среде при pH 1,6—2,6 методом электрофореза с охлаждением (рис. 12.23 и 12.24).

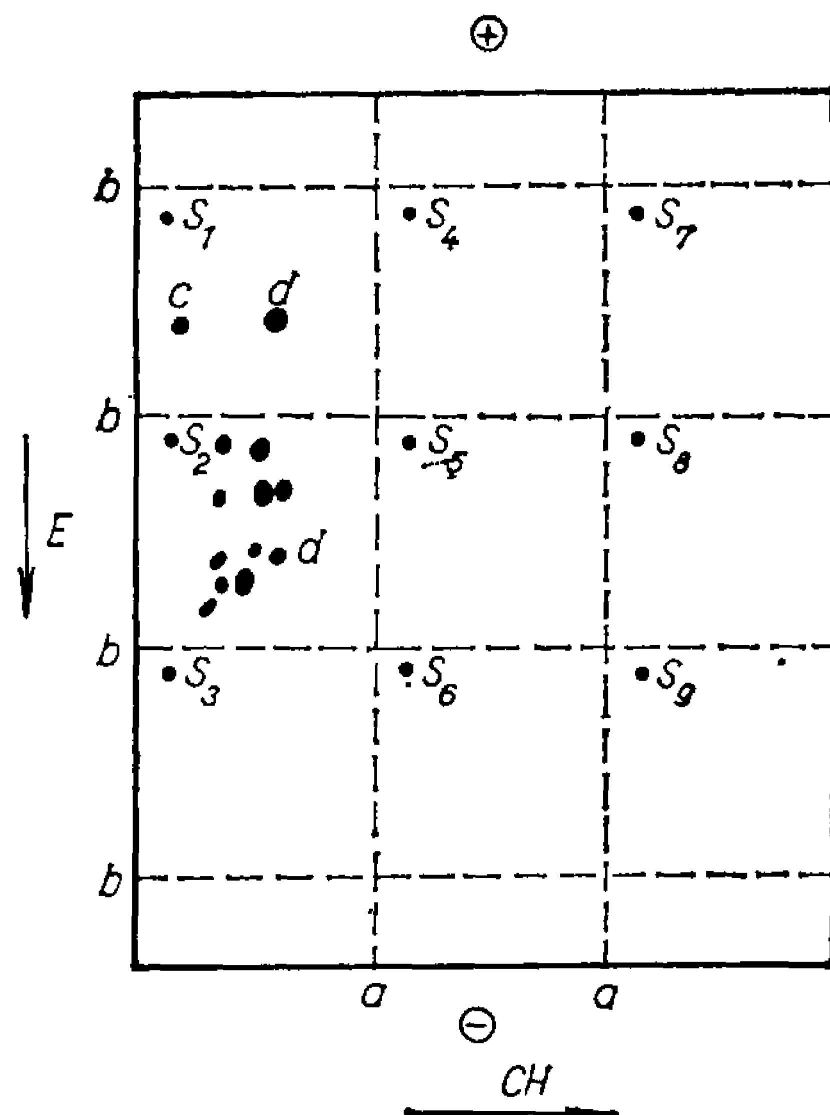


Рис. 12.25. Разметка листа бумаги и результаты разделения пептидов методом двухмерной хроматографии [82].

Стрелка *E* указывает первое направление электрофоретического разделения, стрелка CH направление восходящей хроматографии, S_1—S_9 — точки нанесения образцов с добавкой индикатора моно(динитрофенил)этилендиамина. После электрофореза и высушивания бумагу разрезают по линиям *a*, а после хроматографии по линиям *b*. Положение индикатора после электрофореза указано буквой *c*, после хроматографии индикатор сдвигается в точку *d*. Квадрат с образцом — это S_2-пептидная карта фракции пептидов триптического гидролизата альбумина, модифицированного малеиновой кислотой, после обнаружения нингидрином. Условия разделения приведены в тексте.

Электрофорез аминокислот и пептидов на бумаге проводили методом Михля с охлаждением инертными жидкостями [69], который может быть успешно использован даже для получения пептидных карт. Примеры разделения пептидов приведены на рис. 12.25, а состав буферов для разделения — в табл. 12.13. Аминокислоты и пептиды разделяли также методом электрофореза в тонком слое целлюлозы [28] и силикагеля [42]. В этом методе хроматография (в основном ТСХ) предшествует электрофорезу, который применяется для анализа во втором направлении (см. табл. 12.5).

АМИНОКИСЛОТНЫЕ И ПЕПТИДНЫЕ КАРТЫ

Принцип метода состоит в последовательном разделении смесей с помощью электрофореза, а затем хроматографировании разделенных компонентов в другом направлении. Этот метод также называют методом «отпечатков пальцев» [43]. В зависимости от применяемого типа электрофореза в качестве первого метода анализа могут быть выбраны электрофорез или хроматография. Если используется электрофорез с постоянным

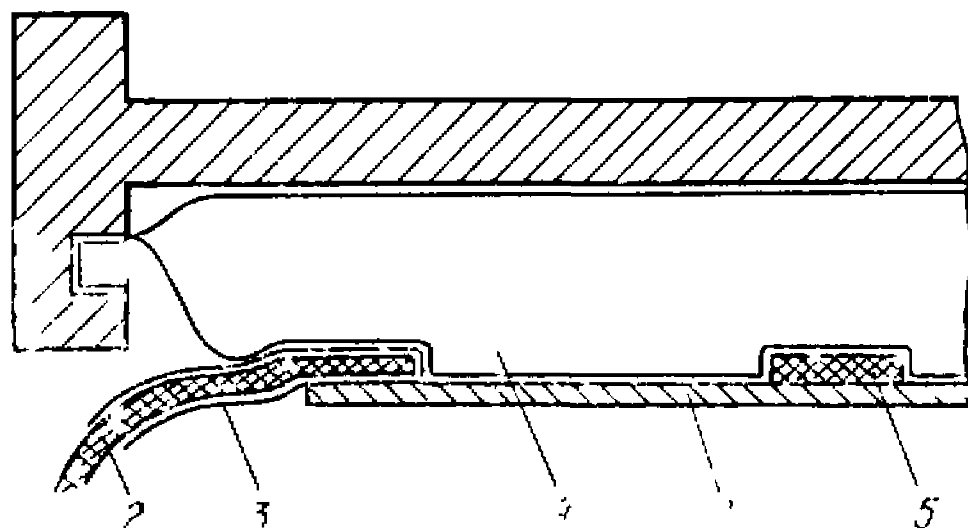


Рис. 12.26. Способ переноса образца при двухмерном разделении методом высоковольтного зонного электрофореза на бумаге [82].

1 — электрофоретический носитель (бумага); 2 — бумажная полоска (проводники для подвода тока от электродной камеры); 3 — полупроницаемая обертка проводников из мембраны для диализа; 4 — полиэтиленовый мешок с сжатым воздухом; 5 — бумажная полоска с разделенными образцами после разделения в первом направлении.

отводом тепла, то сначала предпочтительно проводить электрофоретическое разделение.

Методика Прусика и Штепанека [82]. На бумаге ватман № 3 или 3 ММ размером 460×570 мм симметрично наносят девять квадратов размером 150×150 мм. Таким образом мы получим квадрат размером 450×450 мм, куда можно нанести 9 образцов, и свободные края для анода и катода (рис. 12.25). Линию старта проводят на расстоянии 25 мм от анодного края каждого квадрата. Бумагу помещают на холодную пластину для горизонтального электрофореза и смачивают буферным раствором (150 мл уксусной кислоты +50 мл 98%-ной муравьиной кислоты Н+дистиллированная вода до 1 л). Избыток буферного раствора промокают сухой фильтровальной бумагой и влажную хроматограмму покрывают листом фильтровальной бумаги. Затем эту бумагу прижимают к нижней бумаге фотографическим валиком до тех пор, пока вся поверхность электрофоретической бумаги не станет равномерно белой. Фильтровальную бумагу меняют несколько раз — обычно достаточно двух или трех листов. Для снижения давления паров электролита необходимо включить охлаждение, но температура должна быть выше точки росы, чтобы предотвратить избыточную конденсацию на бумаге паров воды из воздуха. Затем на линии старта наносят

растворы образцов (см. также рис. 12.26) и добавляют к смеси водный раствор желтого индикатора миграции моно(динитрофенил)этилендиамина. Бумажные проводники, подводящие ток от электродной камеры, прижимают к краям носителя. Проводники, сделанные из прочной хроматографической бумаги, заворачивают в мембраны для диализа размером 20×20 мм (тип «Kalle»), предохраняющие проводники от пересыщения электрофоретическим носителем. Проводники и носитель (бумагу) прижимают полиэтиленовым мешком со сжатым воздухом при давлении 0,05 кГс/см^2 и соединяют электроды с источником питания на 5000 В. Через 12 мин, т. е. когда желтый индикатор отойдет примерно на 60 мм от старта, питание отключают и вынимают электрофореграмму. После высушивания в токе теплого воздуха при 30—50 °С для полного удаления кислот (не менее чем в течение часа) большую часть катодного и анодного краев отрезают, а квадрат с образцами разрезают параллельно направлению электрофореза на 3 полоски, каждая из которых состоит из трех квадратов. Полоски сворачивают в цилиндры и подвергают восходящей хроматографии в системе бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода (90 : 60 : 18 : 72). Положение индикатора не идентично положению аминокислот. Примерно через 2 ч хроматографию заканчивают, бумажные цилиндры разворачивают и полоски высушивают в токе воздуха. Затем полоски протягивают через 0,2—1%-ный раствор нингидрина в ацетоне. Отметив карандашом положение индикатора, полученную окраску стабилизируют путем протягивания полосок через 1%-ный раствор нитрата меди(II). Можно также обнаруживать отдельные квадраты в маленьких хроматографических камерах и провести различные обнаружения на равных количествах образца, например хлорированием по Рейндлу и Хоппе [83]. Этот тест более чувствителен на пептиды, но дает менее стабильную окраску и может быть использован после того, как «отпечатки пальцев» обнаружены нингидрином.

ЗОННЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДИМЕТИЛАМИНОНАФТИЛСУЛЬФОНИЛЬНЫХ (DNS) ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ

Для разделения DNS-производных аминокислот обычно применяют двухмерную хроматографию, однако при наличии больших количеств побочных продуктов замещения ее проведение наталкивается на трудности, особенно в процессе определения DNS-производных основных аминокислот и *о*-DNS-производных тирозина. Основные аминокислоты хорошо разделяются электрофоретически на пластинках («Polyamide Layer») размером 150×150 мм, покрытых слоем полиамида фирмы «Cheng Chin

Trading Co. Ltd.» No. 75, Sec. 1, Hankow St. Taipei (о. Тайвань).

Методика. От тонкослойного полиамидного листа отрезают полоску 50×150 мм. На расстоянии 30 мм от анодного края полоски острым мягким карандашом осторожно отмечают старт. Полоску погружают на 10 мин в 16%-ный водный раствор муравьиной кислоты и затем влажную полоску помещают на охлаждаемую пластину электрофоретического прибора (например, типа «Pherograph», согласно Виланду и Пфлейдереру [107]) или в прибор для тонкослойного электрофореза фирмы CAMAG (1432 Muttenz, Швейцария). Температуру поддерживают при 12 °С. Мягким нажатием фильтровальной бумаги высушивают полоску, так чтобы выдавить наружу избыток жидкости между подложкой и пластиной и удалить влагу, находящуюся в верхнем слое полоски. После того как фильтровальная бумага перестанет поглощать влагу, из пипетки «Microcaps» объемом 25 мкл (фирма Drummond) наносят точно отмеренные образцы объемом 0,5—1 мкл. При ширине полоски 50 мм можно нанести до 6 образцов. На расстоянии около 5 мм от края полоски помещают проводники из бумаги, завернутые в мембрану для диализа и затем все помещают под полиуретановый амортизатор, завернутый в полиэтилен. Амортизатор прижимают стеклянной пластиной и включают электрический ток. Время разделения 20 мин при 8 °С и градиенте напряжения 55 В/см.

Таблица 12.14

Относительная электрофоретическая подвижность диметиламинонафталинсульфониламинокислот в тонком слое полиамида в 16%-ной муравьиной кислоте[a]

Производное	Подвижность	Производное	Подвижность
Phe	0,29	Glu	0,67
Pro	0,46	Thr	0,73
Leu	0,48	Ser	0,83
Ala	0,48	di-Tyr	0,88
Ile	0,48	NH_2	1,00
Met	0,53	O-Tyr	1,20
Gly	0,56	ε-Lys	1,48
Val	0,59	Arg	1,57
Asp	0,67	α-His	1,69

Примечание. В качестве носителя использовали полиамидные листы фирмы Cheng Chin Trading Co., Ltd., No. 75, Sec. 1, (Hankow, о. Тайвань).

[a] Скорость миграции относительно подвижности $NDS-NH_2$, принятой за единицу.

В процессе разделения начальный ток в 3 мА/см вследствие электроосмоса уменьшается до 2 мА/см. После высушивания в потоке теплого воздуха полоску можно обнаруживать в УФ-свете, где DNS-производные флуоресцируют. Количества, рекомендуемые для нанесения, составляют $8\cdot10^{-5}$—$2\cdot10^{-4}$ мкмолей. Использованные полоски сразу после обнаружения можно регенерировать путем элюирования 16%-ной муравьиной кислотой и высушивания. Относительные подвижности не меняются даже на повторно используемых полосках. В качестве стандартного вещества применяют DNS-NH_2. В табл. 12.14 приведены относительные подвижности DNS-аминокислот, причем подвижность DNS-NH_2 принята за единицу.

РАЗДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ИЗОТАХОФОРЕЗА

Готовят стандартную смесь, содержащую 10 нмолей каждой аминокислоты. В систему ввода прибора [например, «Isotachophor» фирмы LKB (Bromma)], снабженного термическим и УФ-детектором, вводят 1—10 мкл раствора. Нейтральные и кислотные аминокислоты в щелочной среде разделяются в виде отрицательных ионов. Лизин и аргинин в системе, содержащей Ba^{2+} в качестве ведущего иона, разделяются в виде катионов. Длина

Таблица 12.15

Примеры подбора системы электролитов для количественного определения пептидов и аминокислот в пептидах после гидролиза 6 н. HCl[a]

Образец	Заряд разделяемых ионов	Электролит		Ток во время детектирования, мА
		ведущий	замыкающий	
Ala, Asp, Glu Gly, Leu, Val, Thr [55]	—	0,01 М HCl 0,02 М аммедиол[б] 0,5% метилцеллюлоза, pH 8,9	0,01 М β-аланин, $Ba(OH)_2$ pH 10	50
Lys, Arg [55]	+	0,005 М $Ba(OH)_2$ 0,015 М валин, pH 9,9	0,02 М трис-буфер 0,005 М HCl, pH 8	90
Продукты синтеза по Мерифильду Ундекапептидные и декапептидные фрагменты фибрина [56]	—	0,005 М HCl 0,006 М трисбуфер 0,5%-ная метилцеллюлоза, pH 7,2	0,01 М валин, $Ba(OH)_2$ pH 9	40

а По данным Копвиллема с сотр. [55, 56].

б Аммедиол — 2-амино-2-метилпропандиол-1,3.

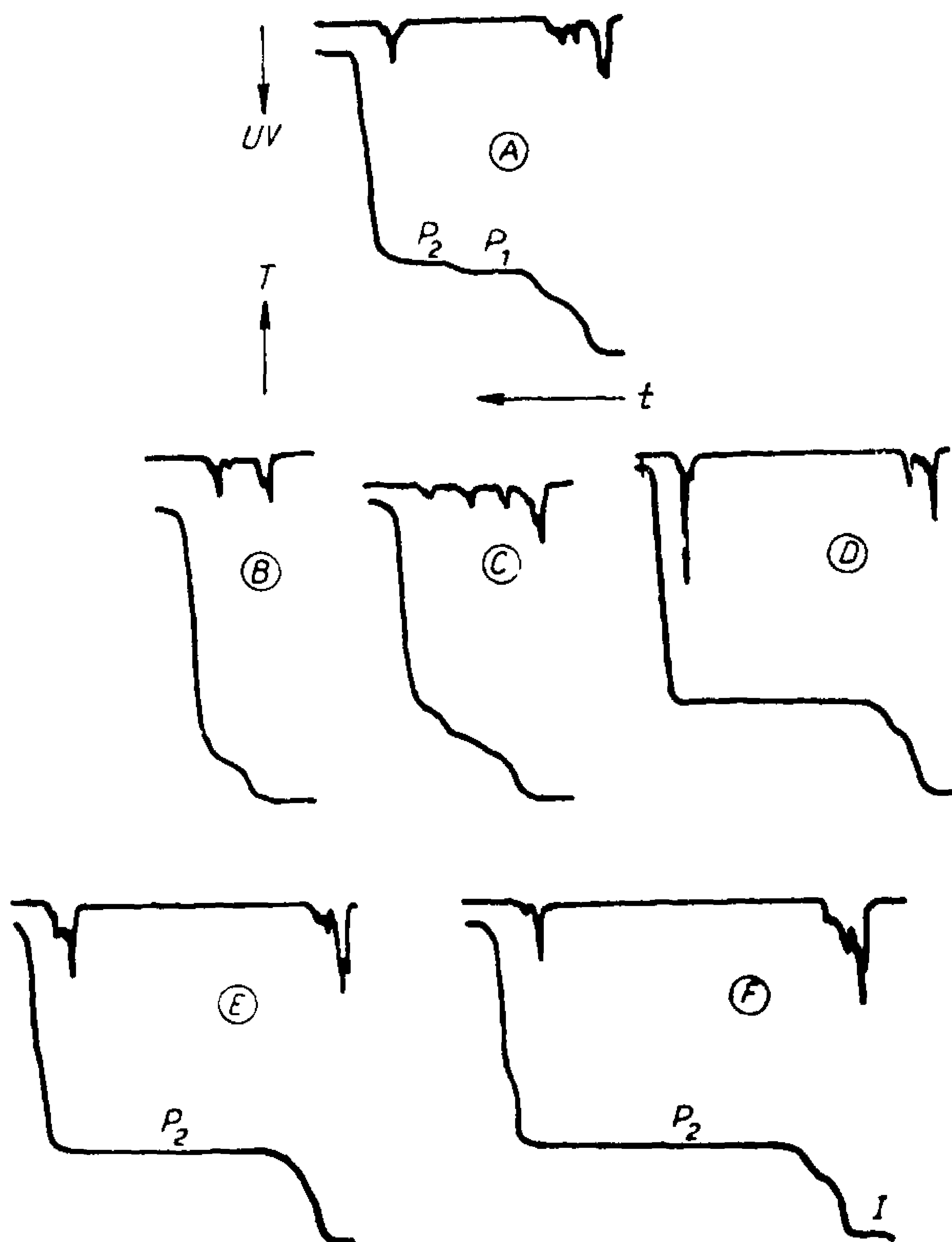


Рис. 12.27. Определение чистоты пептидных фрагментов фибрина, синтезированных твердофазным методом, с помощью капиллярного анионного изотахофореза с термическим детектированием (по данным Копвиллема с сотр. [56]).

A—F — отдельные фракции пептидов, полученные гель-фильтрацией и ионообменной хроматографией. Во фракции *A* пептиды P_1 и P_2 присутствуют в приблизительно эквимолярном соотношении, фракции *B* и *C* содержат только примеси. Фракция *D* содержит преимущественно побочный продукт (87% P_1), фракции *E* и *F* — главный продукт P_2 (83% P_2 во фракции E). Данные о составе электролитов приведены в табл. 12.15. Время анализа одной фракции 10 мин, скорость бумаги 12 см/мин. Процентный состав фракций можно рассчитать из относительной длины зон по калибровке методом стандартных добавок. Запись позволяет также определить содержание ацетат-ионов, которые перемещаются в зоне между ведущим Cl^--ионом и первой УФ-поглощающей примесью (например, фракция *F* содержит 4% уксусной кислоты); на рисунке показана только часть зоны *I*. Стрелка *t* указывает направление оси времени, стрелка *T* — направление увеличения термического сигнала, а стрелка УФ — направление увеличения УФ-поглощения при 254 нм.

зон является мерой количественного содержания индивидуальных аминокислот. При определении анионно мигрирующих аминокислот в качестве индикаторов, очерчивающих границы зоны аминокислот, добавляют УФ-поглощающие вещества в метилцеллюлозе и β-аланин. В процессе разделения основных аминокислот для точного определения ширины зоны используется произ-

водная термического сигнала. По точности определения индивидуальных аминокислот этот метод аналогичен автоматическому анализу. Анализ методом изотахофореза проводят в капилляре диаметром 0,5 мм при постоянной температуре в 20 °С, а УФ-

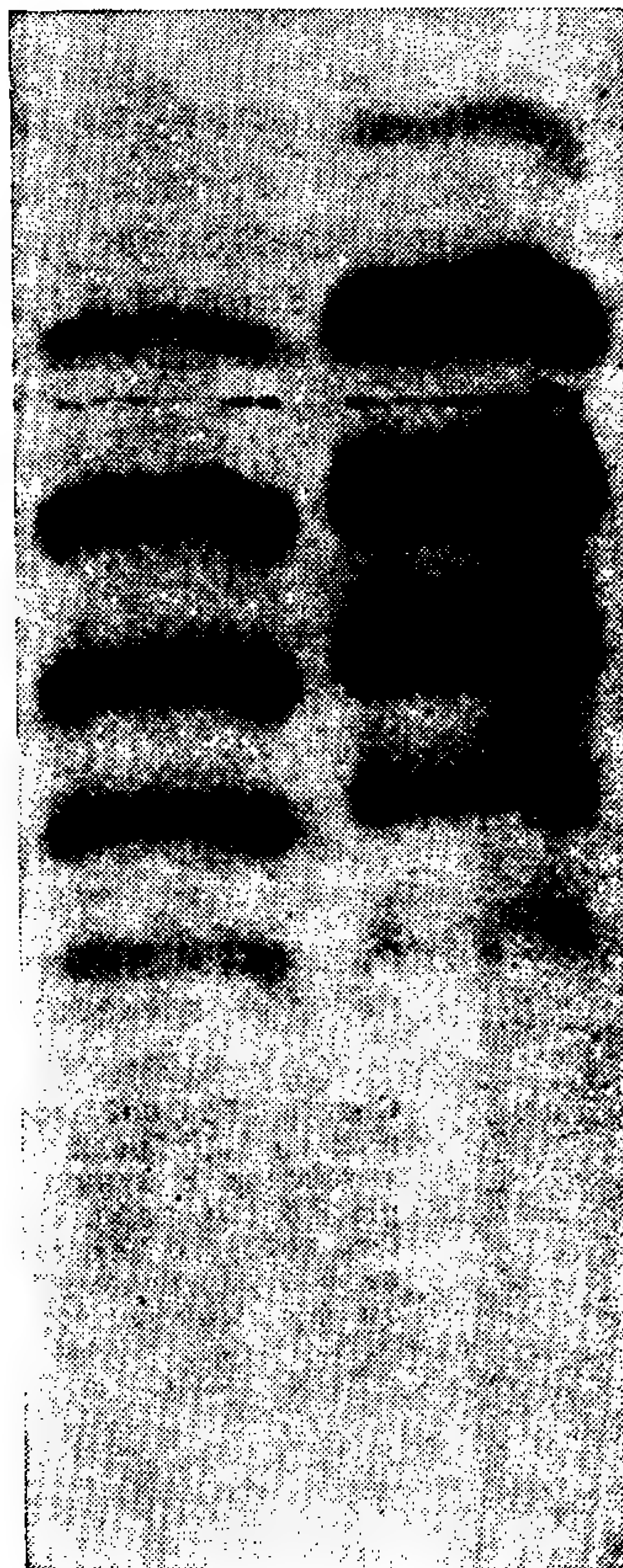


Рис. 12.28. Разделение легких цепей свиного иммуноглобулина методом электрофореза в полиакриламидном геле (по данным Франека и Зорина [25]).

Электрофорез двух фракций легких цепей свиного иммуноглобулина был проведен с помощью горизонтального метода по Франеку. На рисунке старт указан неясной линией около катода. Слой крахмального геля толщиной 2 мм содержит 0,035 М глициновый буферный раствор с pH 8,8 в 3 М мочевине (по данным Коэна и Портера [13]). В электродных камерах находится раствор с pH 8.2, 0.3 М по борной кислоте и 0,06 М по NaOH.

поглощение измеряют при 254 нм. Для нейтральных и кислотных аминокислот применяют капилляры длиной 23—80 см, а для основных аминокислот — длиной 43 см. Разделение длится 10—60 мин в зависимости от длины капилляра. Для проверки степени чистоты синтетических пептидов методом изотахофореза с термическим детектированием требуется 50 мкг пептидной фракции. Нейтральные и кислотные пептиды можно анализировать в виде анионов в щелочной среде, например в системе с хлоридом в качестве ведущего иона в электролите трис-HCl-буфер с замыкающим электролитом валин — $Ba(OH)_2$ (см. табл. 12.15 и рис. 12.27). Основные пептиды можно разделить в

виде катионов в системе с калием в качестве ведущего иона в электролите ацетат калия — уксусная кислота при pH 4,3 и с замыкающим электролитом β-аланин — уксусная кислота при pH 4,3. Концентрации ведущего и замыкающего ионов составляют 0,01 *М* или менее.

12.7.3. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ

Белки отличаются друг от друга по молекулярной массе, форме молекул, заряду и изоэлектрической точке, что позволяет разделять их в электрическом поле. Электрофорез белков был

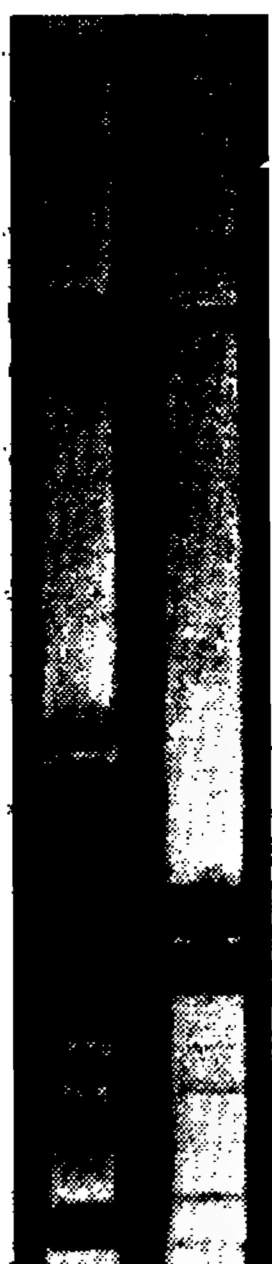


Рис. 12.29. Аналитическое разделение белков и полипептидов методом дискретного электрофореза в колонках с полиакриламидным гелем.

Состав образцов: справа — 0,1 мг смеси ингибиторов протеаз, выделенных из картофеля (Solanum tuberosum L.), слева — 0,1 мг концентрата катепсина Е курицы. Электрофорез в 7,5%-ном разделяющем геле при pH 8,9 (см. табл. 12.6). Пробы помещены в гель образца, полимеризация которого катализировалась рибофлавином (состав геля соответствует фокусирующему гелю из табл. 12.8). Зоны детектируют окрашиванием 1%-ным раствором амидового черного (Амидошварц 10 В, Мерк, Дармштадт).

одной из первых разработанных областей применения этого метода, в связи с чем по разделению белков и продуктов их деградации имеется большое число публикаций. Электрофорез белков проводят при низких потенциалах, так как расширение зон за счет диффузии для больших молекул белка относительно невелико. Простота оборудования и его доступность послужили причиной создания большого числа приборов (см. табл. 12.16 и примеры на рис. 12.28 и 12.29).

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ НА БУМАГЕ

С того времени как Дуррум [18] предложил электрофорез белков на бумаге, описано большое число примеров разделения сывороточных белков, ферментов и других растворимых белков. В настоящее время бумага в качестве электрофоретического носителя для разделения белков вытеснена, например ацетатом целлюлозы. Тем не менее бумага все еще используется, поскольку это дешевый, удобный в обращении материал, который легко хранить. Недостатком бумаги является ее сродство к белкам, например к сывороточному альбумину и гликопротеинам, сорбция которых в процессе разделения приводит к образованию удлиненных пятен.

В простейшем приборе для низковольтного электрофореза белков на бумаге (см. рис. 12.5) оба конца полоски бумаги погружены в электролит, находящийся в электродных камерах. Во время электрофореза электролит движется к центру бумаги за счет капиллярных сил, и влажность, уменьшающаяся в результате испарения, восстанавливается. Электролит, кроме того, движется к катоду вследствие электроосмоса. Если нужно узнать заряд разделяемых веществ, то на старт следует нанести незаряженное соединение, например глюкозу. Ее положение после электрофореза указывает на место фактического старта. Градиент напряжения обычно составляет от 5 до 15 В/см. Для аналитических целей используют более тонкую бумагу, например ватман № 1, а для микропрепаративного разделения более подходит ватман № 3.

Показано, что для разделения сывороточных белков удобны буферы с pH 8,6—9. Для полосок шириной 6 см и длиной 30 см рекомендуется плотность тока 1 мА на 1 см ширины полоски при ионной силе $\mu=0,075$ и времени разделения 16 ч. При плотности тока 2 мА/см для разделения в барбитуратном буферном растворе с ионной силой $\mu=0,05$ достаточно 7 ч [86]. Барбитуратный буферный раствор ($\mu=0,075$, pH 0,6) можно приготовить путем растворения 2,76 г диэтилбарбитуровой кислоты и 15,45 г диэтилбарбитурата натрия в 1 л воды. Боратный буферный раствор с pH 9,0 готовят путем растворения 8,8 г буры и 0,62 г борной кислоты в 1 л воды. Полоску влажной бумаги промокают между листами фильтровальной бумаги и затем на две трети расстояния от анода до катода наносят образец из расчета около 4 мкл на 1 см ширины. В качестве индикатора миграции можно использовать сывороточный альбумин, окрашенный небольшим количеством бромфенолового синего. После высушивания в термостате при 100 °C электрофореграмму окрашивают, погружая на 10 мин в 1%-ный раствор бромфенолового синего

Таблица 12.16

Некоторые выпускаемые промышленностью приборы для электрофореза белков

Фирма	Среда для стабилизации	Применение	Торговая марка
Buchler Instruments	ПААа[a]-гель	Аналитическое	Polyanalyst
Division, Fortlee,	ПАА-гель	Препаративное	Polyprep 100 или 200
New Jersey, USA	Гель крахмала	Аналитическое	Starch Gel Vertical Electrophoresis Apparatus
Camag, Mützenz, CAM[б] Switzeland		Микроанализ	Schnell Electrophorese GE 66
E-S. Apparatus St.	Агар, агароза	Иммуноэлектрофорез, аналитическое	Immunoelectrophoresis cell EC 640
Petersburg, Florida USA	Гель крахмала (блок) ПАА-гель (блок)	Препаративное Препаративное до 100 мг или аналитическое (30 образцов)	EC 400 Vertical Gel Cell EC 470, 490
Hoefer Scientific	ПАА-гель (блок)	Препаративное или аналитическое до 20 образцов	Slab Unit All S
Inst., San Francisco, California, USA	ПАА-гель	Аналитическое (8 образцов)	Gel Tube Unit DE 108
Labor MIM-Budapest, Budapest, Hungary	Гель агара	Иммуноэлектрофорез, аналитическое	Agar-Gel Electrophoresis Apparatus OE-103
	Бумага	Аналитическое, макроиммуноэлектрофорез	OE-206

LKB-Produkter, Bromma, Sweden	ПАА-гель	Препаративное	Uniphor 7900 Column Electrophoresis System
Mikrochemical Sp. Co. Berk., California, USA	Бумага	Аналитическое	Gordon-Misco Multiple-Cell Paper Electrophoresis Apparatus
Pharmacia, Uppsala, Sweden	ПАА-гель (блок)	Аналитическое	Gel Electrophoresis Ge-4
Quickfit Inst., Stone, Staffordshire, England	ПАА-гель	Препаративное до 200 мг	Prep-PAGE Module 345 PF
		Аналитическое (16 колонок)	Standard Model 16 PE 34
	САМ	Микроанализ	PAC/5
Savant Inst., Hicksville, N. Y., USA	ПАА-гель	Аналитическое (20 колонок)	Acrylamide Gel Cell DEC 12-20
Shandon Scient. Co., London, England	САМ	Микроанализ	Electrophoresis Tank (after Kohn)
Wissenschafflich.-Technishe Werk. GMBH, OB, BRD	ПАА-гель	Препаративный количественный анализ	Discophor Automat Modell EA 100

[а]ПАА — полиакриламидный гель.
[б]САМ — ацетатцеллюлозная пленка.

в 95%-ном этаноле, насыщенном $HgCl_2$. Полоски затем промывают 1%-ной уксусной кислотой. После обесцвечивания полоски дважды промывают метанолом и высушивают на воздухе.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ БЕЛКОВ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ В ПРИСУТСТВИИ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА

В присутствии додецилсульфата натрия (SDS) белки образуют комплексы анионного характера. Если концентрация SDS выше $8 \cdot 10^{-4}$ М, то количество SDS, связанного с единицей массы белков, постоянно и составляет 1,4 г SDS на 1 г белка. Это

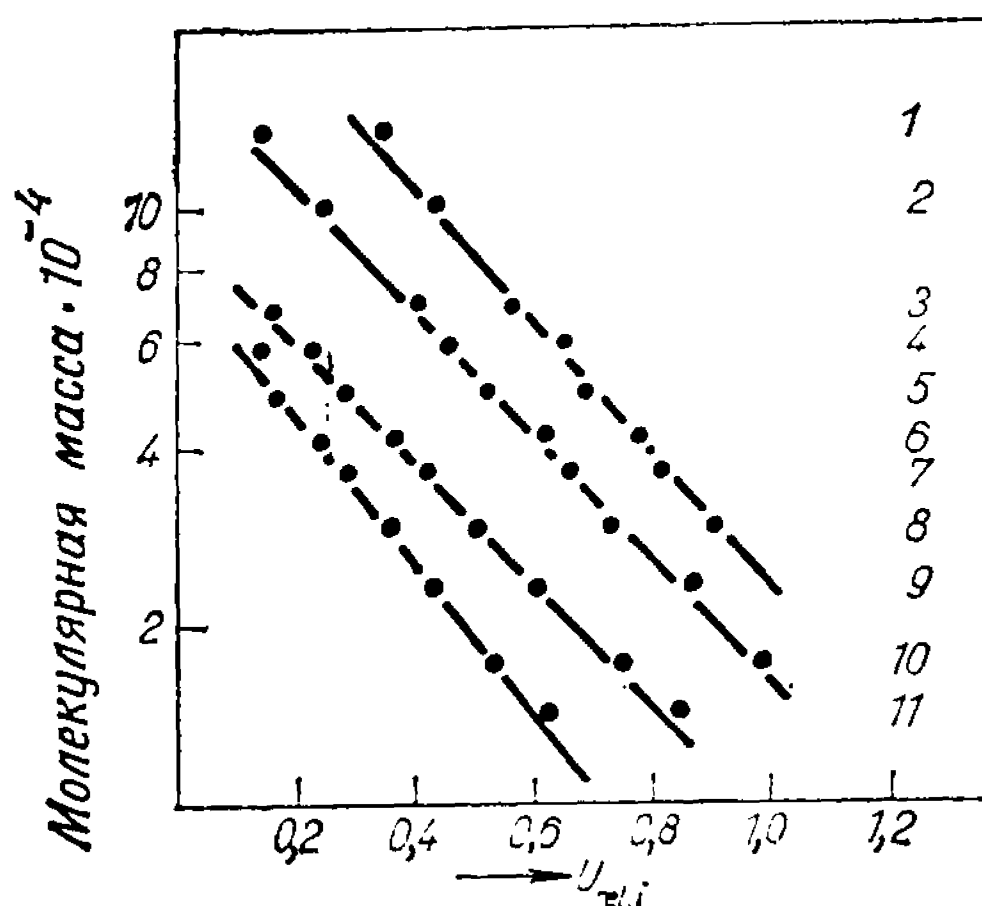


Рис. 12.30. Графическое определение молекулярной массы белков методом электрофореза в полиакриламидном геле в среде додецилсульфата (по данным Вебера с сотр. [105]).

Графическое изображение линейной зависимости между log M, W и $u_{\text{отн}, i}$, где $u_{\text{отн}, i}$ — подвижности белка относительно подвижности бромфенолового синего. На прямых линиях *a*, *b*, *c*, *d* (концентрации полиакриламидного геля 15%, 10% , 7,5% и 5% при постоянном соотношении акриламид — метиленбисакриламид 37 : 1) приведены относительные подвижности рекомендуемых стандартных белков. Белки обозначены цифрами от 1 до 11, а их молекулярные массы (в тысячах) даны в скобках: *1* — β-галактозидаза из *E. coli* (131), *2* — фосфорилаза из мышц (100), *3* — сывороточный альбумин (68), *4* — каталаза из печени (58), *5* — фумараза из мышц (49), *6* — альдолаза из мышц (40), *7* — дегидрогеназа глицеральдегид-3-фосфата из мышц (36), *8* — ангидраза угольной кислоты (29), *9* — трипсин (23,3), *10* — миоглобин (17,2), *11* — яичный лизоцим (14,3). Сывороточный альбумин связывает аномально низкое количество SDS, если он сильно не восстановлен; перед определением трипсина следует провести ингибирование протеолитической активности.

соотношение применимо к простым пептидным цепям, в которых отсутствуют стерические препятствия образованию связей с SDS. Однако оно неприменимо, например, к гликопротеинам и пептидным цепям, имеющим дисульфидные мостики. Примерно одна молекула связывается с двумя аминокислотными остат-

ками. Величина отрицательного заряда пропорциональна длине пептидной цепи. Заряд пептидной цепи незначителен по сравнению с зарядом комплекса SDS — пептид. Следовательно, электрофоретическая подвижность пропорциональна логарифму молекулярной массы полипептидной цепи. Молекулярную массу неизвестного белка находят из графика зависимости относительной электрофоретической подвижности белковых стандартов известной молекулярной массы от логарифма их молекулярной массы (рис. 12.30). В случае нелинейности кривой следует обратиться к работе [105].

Методика Вебера с сотр. [*105*]. Неизвестный белок и стандартный белок в предполагаемом диапазоне молекулярных масс восстанавливают путем инкубирования в 1%-ных растворах SDS и меркаптоэтанола при 100 °С в течение 3 мин, чтобы исключить влияние S—S-связей и протеолитической активности.

Для одной колонки в небольшой пробирке смешивают с гелем 5 мкл 0,05%-ного раствора бромфенолового синего (например, натриевая соль бромфенолового синего, Serva, Гейдельберг) в 0,01 *М* фосфатном буферном растворе с pH 7,0, одну каплю глицерина и 5 мкл меркаптоэтанола и добавляют 1—20 мкг полипептида, инкубированного при 100 °С в восстановительной среде (как указано выше). Общий объем доводят до 50 или до 150 мкл буферным раствором образца (0,01 *М* фосфат, доведенный с помощью NaOH до pH 7,2 и содержащий 0,1% меркаптоэтанола и 0,1% SDS). Раствор из пастеровской пипетки вводят в верхнюю часть колонки с полиакриламидным гелем, находящейся в приборе.

Для приготовления геля необходимы следующие реагенты: I) Буферный раствор для геля: 7,8 г $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$+38,6 г $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$+2,0 г SDS доливают водой до 1 л; SDS можно кристаллизовать из этанола; II) 22,2 г акриламида +0,6 г метиленбисакриламида+вода до 100 мл; III) 44,4 г акриламида +1,2 г метиленбисакриламида+вода до 100 мл; IV) 1,5%-ный водный раствор персульфата аммония, приготовленный непосредственно перед использованием; V) N,N,N′,N′-тетраметилэтилендиамин (TEMED), который хранят в темной склянке при 4 °С.

Стеклянные трубки длиной 100 или 200 мм и диаметром 5 мм обрабатывают горячей азотной кислотой или хромовой смесью, затем тщательно промывают водой и высушивают в сушильном шкафу. На трубках делают отметку на расстоянии 30 см от одного конца, устанавливают их вертикально, заполняют до отметки полимеризационной смесью, приготовленной в соответствии с табл. 12.17, и обезгаживают содержимое трубок под действием вакуума. Нижние концы трубок закрывают резиновыми крышками от склянок для сыворотки. Оптимальная концентра-

Таблица 12.17

Состав гелей для электрофореза в полиакриламидном геле с SDS[a] для определения молекулярной массы пептидов и белков [105]

Концентрация акриламида в геле, %	3,3	5	7,5	10	15	20
Компоненты смеси	Объем, мл					
I	15	15	15	15	15	15
II	4,5	6,75	10,1	13,5		
III					10,1	13,5
IV	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
V	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
H_2O	9,0	6,75	3,4		3,4	
Примерный диапазон молекулярных масс	$<10^6$	$>2,5\cdot10^4$ $<2\cdot10^5$	$>1,2\cdot10^4$ $<10^5$	$>10^4$ $<7\cdot10^4$	$<5\cdot10^4$	$<1,5\cdot10^4$

Состав растворов I—V приведен в тексте. Приведенные объемы конечных растворов достаточны для приготовления 16 столбиков геля размером 0,5×7 см.

[a] SDS — додецилсульфат натрия.

ция акриламида составляет 7,5%. В зависимости от результата для маленьких молекул можно взять более высокую концентрацию, а для больших более низкую. Полимеризационную смесь после перемешивания помещают в трубки, удаляют пузырьки воздуха и осторожно заливают сверху примерно 0,1 мл воды. После полимеризации, которая занимает около 20 мин, слой воды сливают, а вместо него вносят раствор образца. Когда трубка уже вставлена в аппарат, раствор образца покрывают сверху электродным буферным раствором, который состоит из смеси (1 : 1) раствора I и воды.

Когда образец входит в гель, электрофорез одной трубки диаметром 5 мм проводят при токе 3 мА, а остальное время его ведут при токе 5—5,5 мА. Электрофорез следует осуществлять при комнатной температуре. Когда окрашенный индикатор доходит до нижнего конца геля, электрофорез заканчивают. Затем между гелем и стеклянной стенкой трубки вводят тонкую иглу шприца и передвигают ее вдоль внутренней стенки трубки, одновременно нажимая на поршень шприца. Очень плотные гели

вынимают, разбив стеклянную трубку. Центр зоны индикатора обычно отмечают накалыванием, например с помощью тонкой медной проволоки.

Зоны окрашивают так же, как описано для дискретного электрофореза в полиакриламидном геле. Наиболее чувствительным является обнаружение с помощью кумасси синего R 250 (Serva, Гейдельберг): 1,25 г этого красителя растворяют в 227 мл метанола и добавляют 46 мл уксусной кислоты. Раствор разбавляют водой до 500 мл и фильтруют. Гели высушивают в течение 2—12 ч. Обесцвечивание проводят в растворе, содержащем 50 мл метанола и 75 мл уксусной кислоты в 1000 мл воды, путем диализа или электрофореза (см. выше).

После того как трубку вынимают из аппарата, измеряют длину геля A и расстояние B, которое прошел окрашенный индикатор. Затем гель обнаруживают и измеряют длину геля после окрашивания C, а также расстояние зон белков от старта D_i. Относительную подвижность приводят к единице подвижности индикатора и выражают в виде $U_{rel,\,i}=AD_i/BC$. Если положение красителя обнаружено, можно использовать отношение $U_{rel.i}=D'_i/B'$, где B' — расстояние центра окрашенной зоны индикатора от старта после окрашивания.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ В ЛИНЕЙНОМ ГРАДИЕНТЕ КОНЦЕНТРАЦИИ [90]

Линейный градиент ПАА геля можно приготовить путем смешивания растворов, содержащих 5 и 30% акриламида и 5% бис(N,N'-метиленбисакриламида) (Бис). Можно использовать продажную смесь акриламида и Бис, под названием Cyanogum 41 (Canal Ind. Corp. Rockville, Maryland, США). 1) *5%-ный гель:* 5 г Cyanogum 41 (или приготовленной смеси акриламида и Бис) + +2,86 мл буферного раствора (в 33 раза более концентрированного, чем электродный буферный раствор соответствующего состава) + 0,085 мл диметиламинопропионитрила (DMAPN) + +0,85 мл 10%-ного раствора персульфата аммония разбавляют дистиллированной водой до 100 мл. 2) *30%-ный гель:* 36 г Cyanogum 41 (или соответствующей смеси акриламида и 5% Бис) + 2,52 мл буферного раствора (в 33 раза более концентрированного, чем электродный буферный раствор) + 0,60 мл 10%-ного раствора персульфата аммония разбавляют дистиллированной водой до 120 мл.

Оба раствора обезгаживают вакуумированием и охлаждают при —5 °С в течение 20 мин перед наложением градиента. Затем 75 мл 5%-ного раствора акриламида помещают в цилиндр диаметром 4,5 см, снабженный магнитной мешалкой, а другой

сосуд заполняют 75 мл 30%-ного раствора. После этого смесь медленно поступает снизу в сосуд для полимеризации, в котором на расстоянии 3 мм друг от друга помещены две стеклянные пластинки размером 200×200×1 мм. Пластинки по краям разделены пластиковыми прокладками толщиной 3 мм (в форме прямоугольных треугольников со сторонами 10 и 200 мм). Окончательная форма геля — это трапеция высотой 200 мм с нижним основанием длиной 180 мм и верхним основанием 200 мм. При использовании трафарета в геле во время полимеризации образуется небольшой желобок объемом 50 мкл. Электрофорез проводят при 4 °С; при 350—410 В время разделения около 40 ч. Для определения молекулярной массы белков наиболее подходящим является произведение времени на напряжение от 18 000 до 26 000 В·ч, так как именно в этом диапазоне при линейном градиенте концентрации полиакриламида соблюдается соотношение $\log$ (мол. массы) $= C - k \log D$, где D — расстояние зоны от старта (см). По данным Слейтера $k = 1{,}75$ и $C = 6{,}57$. После удаления стеклянных пластинок зоны проявляют обычным способом путем окрашивания амидовым черным 10 В (1 г в 100 мл 7%-ной уксусной кислоты). Наносимый образец сгущают добавлением сахарозы (20 мкл сыворотки и 20 мкл 20%-ного раствора сахарозы). Пример такого разделения приведен на рис. 12.8.

ПРЕПАРАТИВНЫЙ ИЗОТАХОФОРЕЗ ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА [93]

Препаративный ИТФ в полиакриламидном геле можно выполнять на приборе для препаративного электрофореза в полиакриламидном геле. В связи со значительным увеличением объема полиакриламидного геля во время прохождения зон, поверхность геля становится выпуклой, если гель прилипает к стенкам прибора. По этой причине прибор, изготовленный из плексигласа, к которому полиакриламидный гель не прилипает, лучше, чем стеклянный прибор. Экспериментальные условия следующие: площадь сечения геля 5,3 см^2, длина трубки 20 см, толщина стенки 0,2 см, скорость элюирования 28 мл/ч, стабилизованный ток 10 мА, температура охлаждающей воды 10 °С.

Состав исходных растворов для приготовления геля приведен в табл. 12.18. Смесь для полимеризации приготавливают путем смешения следующих растворов: 10 мл *а*, разбавленного в 10 раз водой, 10 мл *б*, 5 мл *в*, 10 мл *г*, 5—10 мл *е* и воды до 100 мл.

Раствор *е* добавляют только в том случае, если фотополимеризация происходит слишком медленно. Растворы следует готовить при температуре, не превышающей 10 °С. Раствор-инициа-

тор и дополнительный раствор-инициатор следует готовить непосредственно перед употреблением. Фотополимеризация ускоряется при облучении флуоресцентной лампой и лампой дневного света; трубку для разделения помещают между 14-ваттной лампой дневного света Daylight фирмы «Canalco» (Canal Ind. Corp. Maryland, США) и белой отражающей поверхностью.



Рис. 12.31. **Препаративный изотахофорез компонентов гемоглобина человека в полиакриламидном геле** (по данным Свендсена [93]).

УФ-поглощение элюированных фракций при 254 нм регистрируют на проточном абсорбциометре Uvicord 4701 A фирмы LKB, (Bromma, Швеция). Скорость бумаги 1 см/ч, направление оси времени слева направо. Условия разделения приведены в тексте и в табл. 12.18.

Этот метод используется для фракционирования компонентов гемоглобина человека. Смешивают 0,3 мл 10%-ного (масса/объем) раствора гемоглобина человека с 1,6 мл Ampholine, p*I* 6—8 (LKB Producter AB, Bromma 1, Швеция) и 30 мл катодного буферного раствора *e* (табл. 12.18) и осторожно заливают эту смесь в трубку для разделения поверх геля. После подключения системы охлаждения и насоса для элюента включают постоянный ток 10 мА. Зоны детектируют визуально или путем записи профиля элюирования по УФ-поглощению. Для этого используют проточный УФ-абсорбциометр, LKB Uvicord

Таблица 12.18

Основные исходные растворы для препаративного изотахофореза в полиакриламидном геле [93]

а) Буферы для геля с pH 6,2:	
MES[а]	7,3 г
TEMED[б]	0,3 мл
трис[в]	2,0 г
H_2O дист. до	100 мл
б) Раствор для получения геля:	
акриламид	33 г
H_2O дист. до	100 мл
в) Раствор для получения геля:	
бисакриламид	2 г
H_2O дист. до	100 мл
г) Раствор-инициатор:	
рибофлавинфосфат	8 мг
H_2O дист. до	100 мл
д) Дополнительный раствор-инициатор:	
персульфат аммония	100 мг
H_2O дист. до	100 мл
е) Замыкающий катодный буферный раствор с pH 8,9;	
ε-аминокапроновая кислота	60 г
трис	3 г
H_2O дист. до	2000 мл
ж) Анодный и элюирующий буферный раствор с pH 7,1:	
1 M H_2SO_4	121 мл
трис	32 г
H_2O дист. до	4000 мл

[а] MES — морфолинэтансульфокислота.
[б] TEMED — тетраметилэтилендиамин.
[в] Трис — трис(оксиметил)аминометан.

(Bromma), тип 4701, работающий при 254 нм при скорости протяжки ленты 10 мм/ч. Результаты разделения представлены на рис. 12.31.

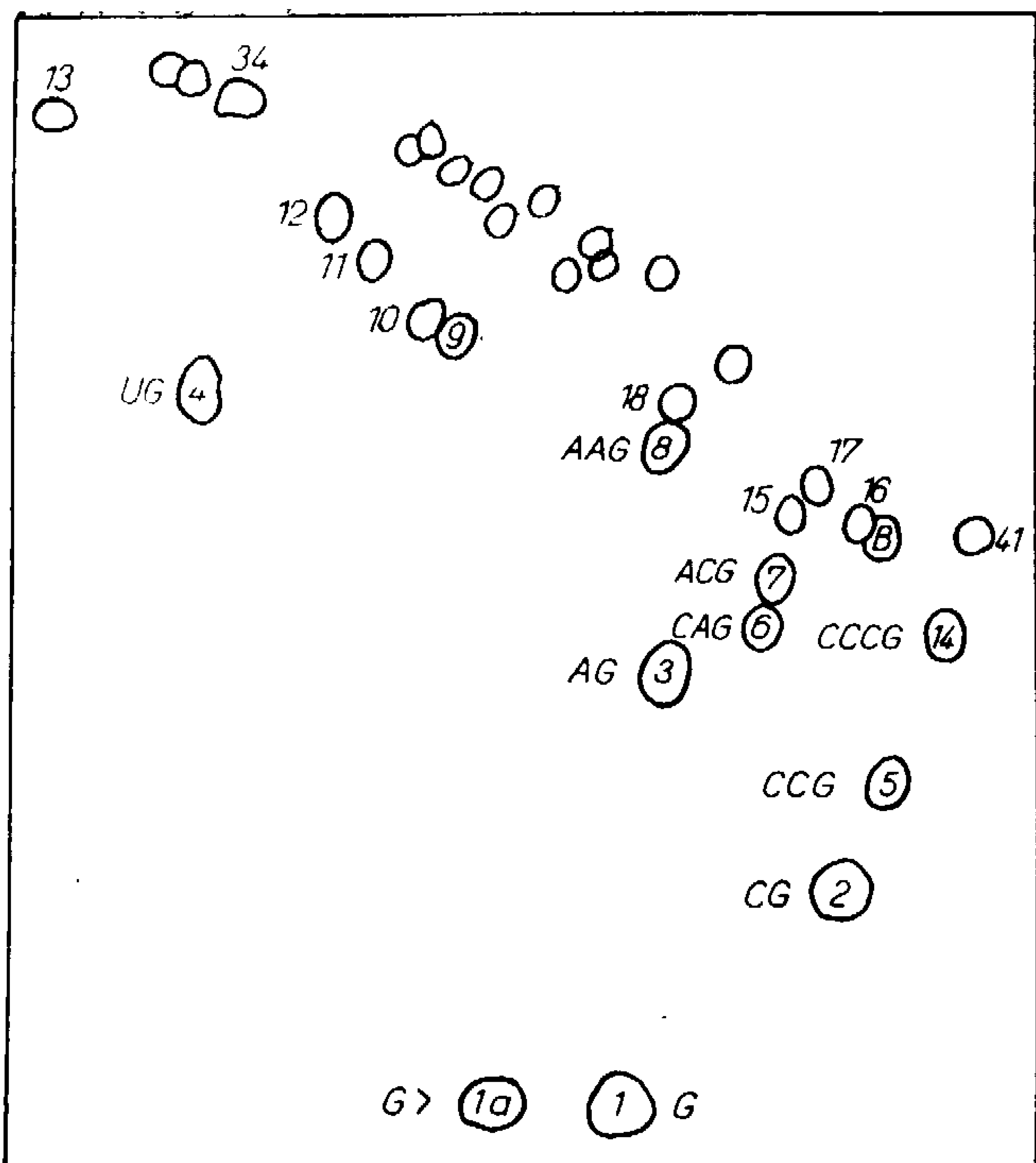
12.7.4. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ ФРАГМЕНТОВ

Нуклеиновые кислоты характеризуются отчетливым отрицательным зарядом и очень высокой молекулярной массой. Поэтому нейтральные гомогенные гели с достаточно большими порами обеспечивают хорошее разделение этих соединений. Размер пор, требуемый для исследования нуклеиновых кислот и их субъединиц, можно определить методом гель-электрофореза при градиенте концентрации, как для белков (см. табл. 12.6). Если механические свойства неплотного полиакриламидного геля непригодны, можно использовать смешанный гель, содержащий 2,5% полиакриламида и 0,5% агарозы. При анализе субъединиц более низкой молекулярной массы концентрацию полиакриламида увеличивают до 3% при 0,5%-ной концентрации агарозы в

геле. Сложные смеси нуклеиновых кислот и их фрагментов исследуют методом двухмерного гель-электрофореза (см., например, [15]). Наряду с этим был разработан метод разделения олигонуклеотидов на бумаге, а также двухмерный электрофорез на ацетатцеллюлозной пленке с последующим разделением на ионообменной бумаге (по данным Сангера с сотр. [85]). Применение электрофореза в этой области иллюстрируется следующим примером.

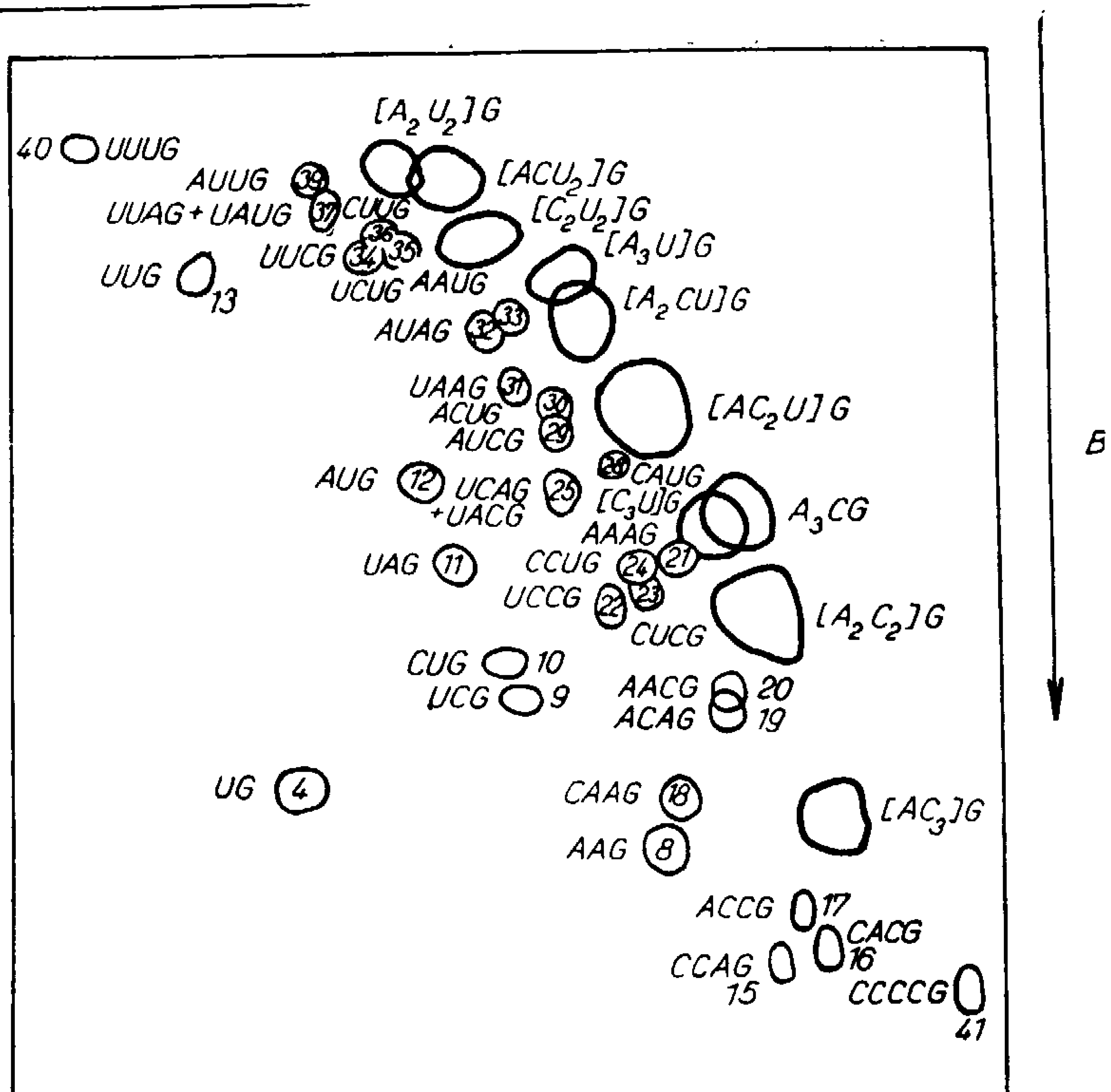
ДВУХМЕРНОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДОВ

Гидролизат РНК, содержащий около 0,1 мг нуклеотидов в 10 мкл, наносят на расстоянии 100 мм от катода на полоску ацетата целлюлозы шириной 30 мм и длиной до 600 мм. Полоску насыщают буферным раствором с pH 3,5, содержащим 0,5% пиридина и 5% уксусной кислоты. После того как образец впитается, с края наносят раствор индикаторов миграции, состоящий из равных объемов растворов кислого фуксина (1%), ксиленцианола FF (1%) и оранжевого G (2%). Полоску помещают в охлаждаемый жидкостью прибор, например в прибор, предложенный Михлем [69]. Электрофорез продолжается в течение 2 ч при напряжении в 3000 В. Нуклеотиды всегда движутся между медленным синим и быстрым розовым индикаторами. По окончании электрофореза влажную полоску подвешивают для того, чтобы испарились остатки охлаждающей жидкости (например, уайт-спирита 100, Esso Petroleum Company). Все еще влажную полоску ацетата целлюлозы помещают на лист DEAE-бумаги размером 470×560 мм на расстоянии около 100 мм от одной из ее меньших сторон. На полоску ацетата целлюлозы помещаются 4 слоя смоченных водой полосок размером 460×20 мм из бумаги ватман № 3 ММ и затем прижимают их стеклянной пластиной так, чтобы нагрузка равномерно распределялась по всем слоям. Вода, проходящая через ацетатную пленку, элюирует нуклеотиды, которые затем связываются ионообменной бумагой. DEAE-бумагу высушивают теплым воздухом, затем увлажняют 7%-ной муравьиной кислотой и помещают в электрофоретическую камеру. В связи с хрупкостью влажной ионообменной бумаги рекомендуется работать на приборе, снабженном подложкой (см., например, [98]) для электрофоретического носителя Нафтона и Хагопяна [71]. Электрофорез при 1500 В продолжается 4—16 ч. Для анализа во втором направлении используется бумага ватман хромедиа DE 81, смоченная 7%-ной муравьиной кислотой [9]. Пример разделения этого типа представлен на рис. 12.32.



A
13
34
12
11
10
9
UG
4
18
AAG
8
17
15
16
B
41
ACG
7
CAG
6
CCCG
14
AG
3
CCG
5
CG
2
G >
1a
1
G

a



Б
40
UUUG
[A_2U_2]G
[ACU_2]G
AUUG
UUAG + UAUG
CUUG
[C_2U_2]G
[A_3U]G
UUCG
UUG
13
UCUG
AAUG
[A_2CU]G
AUAG
UAAG
ACUG
AUCG
[AC_2U]G
AUG
12
UCAG
+UACG
CAUG
[C_3U]G
AAAG
A_3CG
UAG
11
CCUG
UCCG
CUCG
[A_2C_2]G
CUG
10
UCG
9
AACG
20
ACAG
19
UG
4
CAAG
18
AAG
8
[AC_3]G
ACCG
17
CACG
16
CCAG
15
CCCCG
41

б

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bächmann K., Görisch H.*, J. Chromatog., **23**, 336 (1966).
2. *Barrolier J., Watzke E., Gibian H.*, Z. Naturforsch., **13b**, 754 (1958).
3. *Beckers J.*, Thesis, Eindhoven University of Technology (1973).
4. *Beckers J. L., Everaerts P. M.*, J. Chromatog., **51**, 339 (1970).
5. *Bloemendal H., Schoenmakers J.*, Sci. Tools **15**, 6 (1968).
6. *Boček P., Deml M., Janák J.*, J. Chromatog. **91**, 829 (1974).
7. *Brattsten I., Synge R., Watt W.*, Biochem. J. **97**, 678 (1965).
8. *Brauitzer G., Hobom G., Hannig K.*, Z. Physiol. Chem. **338**, 276 (1964).
9. *Brownlee G. G., Sanger F.*, J. Mol. Biol. **23**, 337 (1967).
10. *Buchtela K., Aizetmüller K.*, J. Radioanal. Chem. **1**, 225 (1968).
11. *Carnegie P., Synge R.*, Biochem. J. **78**, 692 (1961).
12. *Chrambach A., Reisfeld R., Wykoff M., Zacchari J.*, Anal. Biochem. **20**, 150 (1967).
13. *Cohem S., Porter R.*, Biochem. J. **90**, 278 (1964).
14. *Cremer H., Tiselius A.*, Biochem. Z. **320**, 273 (1950).
15. *Dahlberg A., Dingenon C., Peacock A.*, J. Mol. Biol. **41**, 139 (1969).
16. *Davis B. J.*, Ann. N. Y. Acad, Sci. **121**, 404 (1964).
17. *Duimel W., Cox R.*, Sci. Tools **18**, 10 (1971).
18. *Durrum E.*, J. Am. Chem. Soc. **72**, 2943 (1950).
19. *Evans G., Strain H.*, Anal. Chem. **28**, 1560 (1956).
20. *Everaerts F.*, Thesis, Eindhoven University of Technology (1968).
21. *Everaerts F., Mulder A., Verheggen T.*, Intern. Laboratory Jan./Feb., 43 (1974).
22. *Everaerts F., Vacik J., Verheggen T., Zuska J.*, J. Chromatog. **60**, 397 (1971).
23. *Finlayson G. R., Chrambach A.*, Anal. Biochem. **40**, 292 (1971).
24. *Flynn F., de Mayo F.*, Lancet **261**, 235 (1951).
25. *Franěk F., Zorina O.*, Collection Czech. Chem. Commun. **32**, 3229 (1967).
26. *Fröhlich Ch.*, Klin. Wochenschr. **45**, 461 (1967).
27. *Gabriel O.*, in Methods in Enzymology (Jakoby W. B., Ed.), Vol. XXII, Academic Press, New York (1971), p. 565—575.
28. *Gerday C., Robyns E., Gosselin-Rey C.*, J. Chromatog. **38**, 408 (1968).
29. *Goodwin L., Jones C., Richards W., Kohn J.*, Brit. J. Exp. Path. **44**, 551 (1963).
30. *Gordon A., Keil B., Šebesta K.*, Natyre **164**, 498 (1949).
31. *Grabar P., Williams C.*, Biochim. Biophys. Acta **10**, 193 (1953).
32. *Graham J., Greenbaum B.*, Am. J. Clin. Pathol. **39**, 567 (1963).
33. *Grassmann W., Hannig K.*, Z. Physiol. Chem. **290**, 1 (1952).
34. *Gross D.*, J. Chromatog. **5**, 194 (1961).
35. *Guest J., Yanofsky C.*, J. Biol. Chem. **240**, 679 (1965).
36. *Haglund H.*, Isoelectric Focusing in pH Gradients, LKB-Produkter AB, Methods of Biochemical Analysis, Vol. 19, Stockholm.

Рис. 12.32. Двухмерный электрофорез олигонуклеотидов (по данным Браунли, Сангера с сотр. [85]).

Олигонуклеотиды из рибосомной меченной ^{32}P РНК, гидролизованной рибонуклеазой Т, разделяют на ацетилцеллюлозной мембране в пиридин-ацетатном буферном растворе при pH 3,5 (см. выше) в направлении стрелки *A*. Зоны переносят на DEAE-бумагу ватман DE 81 и подвергают электрофорезу при pH 1,9 (2,5%-ная муравьиная кислота и 8,7%-ная уксусная кислота по объему) в направлении стрелки *B*. Разделение на рисунке *a* проводят для анализа быстрых компонентов в течение более короткого промежутка времени, составляющего половину полного времени электрофоретической миграции по DEAE-бумаге, по сравнению с разделением на рисунке. Обнаружение с помощью авторадиографии. Зона *B*, в кружочке, соответствует положению синего индикатора миграции ксиленцианоля FF (George T. Gurr Ltd., London). Более подробное описание разделения дано в тексте, где указывается состав электролита в направлении B.

37. *Haglund H.*, Sci. Tools 17, 1 (1970).
38. *Hannig K.*, in Methods in Microbiology (Norris J. and Ribbons D., Eds.), Vol. 5B, Academic Press, New York (1971), p. 512.
39. *Hannig K.*, Z. Anal. Chem. **181**, 244 (1960).
40. *Hannig K.*, *Comsa J.*, Compt. Rend. **256**, 1855 (1963).
41. *Hjerten S.*, Thesis, Uppsala (1967).
42. *Honegger C. C.*, Helv. Chim. Acta **44**, 173 (1961).
43. *Ingram V.*, Biochim. Biophys. Acta **28**, 539 (1958).
44. *Johnson E.*, *Schaffer H.*, Anal. Biochem. **51**, 577 (1973).
45. *Jokl V.*. J Chromatog. **71**, 523 (1972).
46. *Jokl V.*, *Pikuliková Z.*, J. Chromatog. **74**, 325 (1972).
47. *Jokl V.*, *Undeutsch M.*, *Majer J.*, J. Chromatog. **26**, 208 (1967).
47a. *Jokl V.*, *Valášková I.*, J. Chromatog. **72**, 373 (1972).
48. *Jovin T. M.*, Ann. N. Y. Acad. Sci. **209**, 477 (1973).
49. *Kaminski B.*, *Dytkowska O.*, Acta Polon. Pharm. **20**, 237 (1963).
50. *Keck K.*, *Hagen U.*, Biochim. Biophys. Acta **87**, 685 (1964).
51. *Kohn J.*, Biochem. J. **65**, 9 (1957).
52. *Kohn J.*, *Feinberg J.*, Shandon Instrument Applications No. 11, July 1965.
53. *Kolin A.*, *Cox P.*, Proc. Natl. Acad. Sci. US **52**, 19 (1964).
54. *Konstantinov B. P.*, *Oshurkova O. B.*, Dokl. Akad. Nauk SSSR **148**, 1110 (1963).
55. *Kopwillem A.*, *Lundin H.*, LKB Application Notes No. 183.
56. *Kopwillem A.*, *Moberg U.*, *Westin-Sjödahl G.*, *Lundin R.*, *Sievertsson H.*, LKB Application Notes No. 184.
57. *Laurell C.*, Anal. Biochem. **15**, 45 (1966).
58. *Lederer M.*, J. Chromatog. **1**, 86 (1958).
59. *Lederer M.*, *Ward F.*, Anal. Chim. Acta **6**, 355 (1952).
60. *Machebeaue M.*, *Rebeyrotte P.*, *Dubert H.*, *Brunerie M.*, Bull. Soc. Chim. Biol. **35**, 334 (1953).
61. *Majumdar A.*, *Singh B.*, Anal. Chim. Acta **19**, 520 (1958).
62. *Marini-Bettólo G. B.*, *Gogh Frugoni J. A.*, J. Chromatog. **1**, 182 (1958).
63. *Markham R.*, *Smith J.*, Biochem. J. 52, 552 (1952).
64. *Martin A.*, *Everaerts F.*, Proc. Roy. Soc. London **316**, 493 (1970).
65. *Mashburn T.*, *Hoffman P.*, Anal. Biochem. **16**, 267 (1966).
66. *Matthaei J.*, *Voigt H.*, *Heller G.*, *Neth R.*, *Schöch G.*, *Kübler H.*, *Amelunxen F.*, *Sander G.*, *Parmeggiani A.*, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. The Genetic Code, June 25 (1966).
67. *Mehl E.*, *Jatzkewitz H.*, Z. Physiol. Chem. **339**, 260 (1964).
68. *Meier H.*, *Zimmerhackl E.*, *Albrecht W.*, *Bösche D.*, Microchim. Acta, 86 (1970).
69. *Michl H.*, Monatsh. Chem. **82**, 589 (1951).
70. *Mikeš O.*, Chem. Listy **51**, 138 (1957); Collection Czech. Chem. Commun. **22**, 831 (1957).
71. *Naughton M.*, *Hagopian H.*, Anal. Biochem. **3**, 276 (1962).
72. *Offord R. E.*, Nature **211**, 581 (1966).
73. *Ornstein L.*, Ann. N. Y. Acad. Sci. **121**, 321 (1964).
74. *Pastuska G.*, *Krüger R.*, Fourth Chromatography Symposium, Brussels (1966).
75. *Pastuska G.*, *Trinks H.*, Chemiker Ztg. **85**, 535 (1961).
76. *Patchett G. N.*, Automatic Voltage Regulators and Stabilisers, Pitman, London (1954).
77. *Poulik M. D.*, Nature **180**, 1477 (1957).
77a. *Preetz W.*, *Wannemacher U.*, *Datta S.*, Z. Anal. Chem. **257**, 97 (1971).
78. *Prusik Z.*, J. Chromatog. **32**, 191 (1968).
79. *Prusik Z.*, J. Chromatog. **91**, 867 (1974).
80. *Prusik Z.*, *Keil B.*, Collection Czech. Chem. Commun. **25**, 2049 (1960).
81. *Prusik Z.*, *Sedláková E.*, *Barth T.*, Z. Physiol. Chem. **353**, 1837 (1972).

82. *Prusik Z., Štěpánek J.,* J. Chromatog. **87**, 73 (1973).
83. *Reindl F., Hoppe W.,* Ber. **87**, 11 (1954).
84. *Routs R.,* Thesis, Eindhoven (1971).
85. *Sanger F., Brownlee G. G., Barrell B. C.* J. Mol. Biol. **13**, 373 (1965).
86. *Sargent J.,* Methods in Zone Electrophoresis, 2nd Ed., BDH Chemicals, Poole, England (1969), p. 12.
87. *Sarker S.,* Naturforsch. **21b**, 1202 (1966).
88. *Sayre F., Lee R., Sandman R., Perez-Mendez G.* Arch. Biochem. Biophys. **118**, 58 (1967).
89. *Schweiger A., Hannig K.,* Z. Physiol. Chem. **349**, 943 (1968).
90. *Slater G. G.,* Anal. Chem. **41**, 1039 (1969).
91. *Smithies O.,* Biochem. J. **61**, 629 (1955).
92. *Sulkowski E., Laskowski M., Sr.,* Anal. Biochem. **20**, 94 (1967).
93. *Svendsen P.,* Sci. Tools **20**, 1 (1973).
94. *Svendsen P., Rose C.,* Sci. Tools **17**, 13 (1970).
95. *Svensson H.,* Acta Chem. Scand. **15**, 425 (1961).
96. *Svensson H.,* Acta Chem. Scand. **16**, 456 (1962).
97. *Svensson H.,* in Analytical Methods of Protein Chemistry (Alexander P., Block R., Eds.), Pergamon Press, London (1960), p. 195.
98. *Turba F., Pelzer H., Schuster H.,* Z. Physiol. Chem. **296**, 97 (1954).
99. *Vacik J. Zuska J.,* Chem. Listy **66**, 416 (1972).
100. *Vacik J., Zuska J.* J. Chromatog. **91**, 795 (1974).
101. *Vacik J., Zuska J., Everaerts F., Verheggen T.,* Chem. Listy **66**, 647 (1972).
102. *Valmet E.,* Protides Biol. Fluids Proc. Collog. **17**, 401 (1969).
103. *Vesterberg O.,* British Patent No. 1106818, 17 July 1968.
104. *Vesterberg O., Wadström T., Vesterberg K., Svensson H., Malmgren B.,* Biochim. Biophys. Acta **133**, 435 (1967).
105. *Weber R., Pringle J., Osborn M.,* in Methods in Enzymology XXVI, (Hirs C., Timasheff S., Eds.), Academic Press, New York (1972), p. 3.
106. *Wieland T., Fischer M.,* Naturwiss. **35**, 29 (1948).
107. *Wieland T., Pfleiderer G.,* Angew. Chem. **67**, 257 (1955).
108. *Williams F., Pickels E., Durrum E.,* Science **121**, 829 (1955).
109. *Woeller E.,* Anal. Biochem. **2**, 508 (1961).
110. *Yagi Y., Maier P., Pressman D.,* J. Immunol. **89**, 763 (1962).
111. *Zeiller K., Löser R., Pascher G., Hannig K.,* Z. Physiol. Chem. **356**, 1225 (1975).

Глава 13. Обзор литературы

О. МИКЕШ

13.1. ВВЕДЕНИЕ

В этой главе* приведен список монографий по хроматографии, электрофорезу и противоточному распределению, опубликованных с 1962 по середину 1978 г., и периодических изданий по хроматографии. Более двухсот монографий, посвященных этим вопросам, можно найти в «Chemical Abstracts» с 1962 по 1972 г. Вначале приводятся только те книги, в которых рассматривается лабораторное применение методов, а затем приводятся монографии, в которых обсуждается более широкий круг вопросов. В список не включены узкоспециализированные монографии, посвященные анализу какой-либо одной группы соединений, например аминокислот, антибиотиков, белков, стероидов и т. п., сборники хроматографических данных, а также некоторые руководства, написанные в учебных целях. Среди монографий по ионному обмену указаны только книги, посвященные методам разделения.

В разделе А указаны монографии общего характера, в которых излагается ряд хроматографических методов, а также некоторые специальные работы. Специализированные книги по двум или нескольким методам указаны полностью только в одном из разделов (в первом в соответствии с заголовком книги); в последующих разделах дается только краткая ссылка. Если монография выходила в нескольких изданиях, то указывается только последнее; то же относится и к переводам. Заголовки книги даются на языке оригинала.

---

* Этот список является продолжением списка, составленного Прохазкой к монографии Микеша, опубликованной в 1960—1962 гг.

13.2. ПЕРИОДИЧЕСКИЕ ИЗДАНИЯ

Advances in Chromatography (Giddings J. C., Keller R. A., Edits.). M. Dekker, New York (c 1965).

Advances in Gas Chromatography (Zlatkis A., Ettre L. S., Edits.). Preston, Evanston, Ill. University of Houston, Texas; Elsevier, Amsterdam (c 1965).

Chromatographic Reviews (Lederer M., Edit.). Elsevier, Amsterdam (c 1959 до 1971, затем объединен с J. of Chromatography).

Chromatographia. Vieweg, Braunschweig, DDP and Pergamon Press, Oxford (c 1968).

Ion Exchange and Membranes (Science and Technology of Dynamic Macromolecules) (Mikes J. A., Edit.). Gordon and Breach, New York [c 1972 — Vol. 1, No 1 (1972); Vol. 1, No 2 (1972); Vol. 1, No 3 (1973); Vol. 1, No 4 (1974)].

Journal of Chromatographic Science (продолжение Journal of Gas Chromatography) (c 1968).

Journal of Chromatography, Biochemical Applications (Macek K., Edit.). Elsevier, Amsterdam (c 1977).

Journal of Chromatography (International Journal of Chromatography, Electrophoresis and Related Methods; Lederer M., Macek K., Edits.). Elsevier, Amsterdam (c 1959).

Journal of Gas Chromatography. Preston, Evanston, USA (c 1963 до 1968).

Journal of High Resolution Chromatography and Chromatography Communications (Bertsch et al., Edits.), Hüthig Verlag, Heidelberg (c 1978).

Journal of Liquid Chromatography (Cazes J., Edit.). M. Dekker, New York (c 1978).

Progress in Industrial Gas Chromatography (ежегодное издание). Plenum Press (c 1961).

Progress in Thin Layer Chromatography and Related Methods (Niederwieser A., Pataki G., Edits.). Ann. Arbor Sci. Publ., Ann Arbor., Mich. USA (c 1970).

13.3. МОНОГРАФИИ

А. ХРОМАТОГРАФИЯ

Abbott D., Andrews R. S., An Introduction to Chromatography (Concepts in Chemistry). Houghton Mifflin, Boston, 1969.

Abbott D., Andrews R. S., Chemie für Labor und Betrieb. Berufskundliche Reihe, Bd. 17. Chromatographische Methoden. Umschau Verlag, Frankfurt, 1973.

Allsop R. T., Healey J. A. D. Chemical Analysis, Chromatography and Ion Exchange. Heinemann, London, 1974.

Angele H. P. (Edit.), Four-Language Technical Dictionary of Chromatography. Pergamon Press, New York, 1970.

Fifth International Symposium on Chromatography and Electrophoresis. Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor, Mich., USA, 1969.

Recent Progress in Chromatography. Fourth International Symposium on Chromatography and Electrophoresis, Brussels, 1966. Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor Sci. Publ., An Arbor, Mich., USA, 1968.

Bobbit J. B., Scharting A. E., Gritter R. J., Introduction to Chromatography. Reinhold, New York, 1968.

Browning D. R. (Edit.), Chromatography (Instrumental Methods Series). McGraw-Hill, London, 1969.

Browning D. R., Chromatography. The Chemical Detective. Harrap, London, 1973.

Чмутов К. В., Молекулярная хроматография. Наука, Москва, 1964.

Cobanov D. G., Kocev N. K., Khromatografija. Rukovodstvo. Nauka i Izkustvo, Sofie, 1971.

Айвазов Б. В., Практическое руководство по хроматографии. Наука, Москва, 1968.

Daecke H., Laborbücher Chemie Reihe. Chromatographie. Diesterweg, Saele, Frankfurt, 1971.

Dean J. A., Chemical Separation Methods. Van Nostrand, New York, 1969.

Deyl Z., Rosmus J., Juřicová M., Kopecký J., Bibliography of Column Chromatography 1967—1970 and Survey of Applications. Elsevier, Amsterdam, 1973.

Edvards D. I., Chromatography: Principles and Techniques (Laboratory Aids Series). Butterworths, London, 1970.

Epton R. (Edit.). Chromatography of Synthetic and Biological Polymers. Vol. 1. Column packings, GPC, GF and gradient elution. Vol. 2.: Hydrophobic Ion-exchange and Affinity Methods Horwood, Chichester (England), 1978.

Florkin M., Stotz E. H. (Edits.), Comprehensive Biochemistry, Vol. 4 (Separation Methods). Elsevier, Amsterdam, 1962.

Gerritson T. (Edit.), Modern Separation Methods of Macromolecules and Particles (Vol. 2, Progress in Separation and Purification). J. Wiley-Interscience, New York, 1969.

Giddings J. C., Dynamics of Chromatography, Part 1, Principles and Theory. M. Dekker, New York, 1965.

Gordon A. H., Eastoe J. E., Practical Chromatographic Techniques. Newest and Pearson, London, 1964.

Grushka E. (Edit.), Bonded Stationary Phases in Chromatography. Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor, Mich., USA, 1974.

Heftmann E. (Edit.), Chromatography, 3rd Ed. Reinhold, New York, 1975.

Helfferich F., Klein G., Multicomponent Chromatography; Theory of Interscience. M. Dekker, New York, 1970.

Hesse G., Chromatographisches Prakticum. Methoden der Analyse in der Chemie. No 6. Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt a. M., 1972.

Hrapia H., Einführung in die Chromatographie. Akademie Verlag, Berlin, 1965.

Яшин Я. И., Физико-химические основы хроматографического разделения. Химия, Москва, 1976.

Lederer E. (Edit.), Chromatographie en chimie organique et biologique (Vol. 1. Généralités; Applications en chimie organique; Vol. 2. Applications en chimie biologique). Masson, Paríz, 1959, 1960.

Lederer E., Recent Progress in Chromatography. Fourth International Symposium on Chromatography and Electrophoresis, Brussels, 1966. Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor, Mich., 1968.

Lederer M., Michl H., Schlögl K., Siegel A., Anorganische Chromatographie und Electrophorese, Bd. III, Handbuch der Mikrochemischen Methoden (Hecht F., Zacherl M. K., Edits.). Springer-Verlag, Berlin, 1961.

Лурье А. А., Сорбенты и хроматографические носители. Справочник. Химия, Москва, 1972.

Magee R. J. (Edit.), Selected Readings in Chromatography (The Commenwealth and International Library). Pergamon Press, New York, 1970.

Michal J., Chromatografie v anorganické analyse. SNTL, Praha, 1970; перевод на англ. Inorganic Chromatographic Analysis. Van Nostrand, New York, 1974.

Mikeš O. (Edit.), Příručka laboratorních chromatografických metod. SNTL, Praha 1961; перевод на англ. Laboratory Handbook of Chromatographic Methods, Van Nostrand, London, 1964.

Морозов А. А., Хроматография в неорганическом анализе. Высшая школа, Москва, 1970.

Морозов А. А., Кисель Н. А., Оленович Н. Л., Практическое руководство по хроматографическому анализу. Изд. Одесского Гос. университета, Одесса, 1961.

Morris C. J. O. R., Morris P., Separation Methods in Biochemistry. Pitman, Lndon, 1964.

Munier R. L., Principes des methodes chromatographiques. Azoulay, Pariz, 1972.

Ольшанова К. Н., Копылова В. Д., Морозова Н. М., Осадочная хроматография, Изд. АН СССР, Москва, 1963.

Parissakis G. (Edit.), Chromatography and Methods of Immediate Separation. Union Greek Chemists, Athens, 1966.

Pecsok R. L. (Edit.), Experiments in Modern Methods of Chemical Analysis. J. Wiley, New York, 1968.

Perkavec J., Perpar M., Khromatografija. Univ. Fak. Narav. Technol., Ljublana, 1969.

Рачинский В. В., Введение в общую теорию динамики сорбции и хроматографии. Наука, Москва, 1964.

Roberts T. R., Radiochromatography. The Chromatography and Electrophoresis of Radiolabelled Compounds. Elsevier, Amsterdam 1978. *Робертс Т.*, Радиохроматография. «Мир», Москва, 1981.

Savidan L., Chromatography. Iliffe, London, 1966.

Smith I., Chromatographic and Electrophoretic Techniques. (Vol. 1. Chromatography). Heineman, London, 1969.

Stensio K. E., Ekedahl G., Kromatografi och Elektrofores. Norstedt, Stockholm, 1969.

Stock R., Rice C. B. F., Chromatographic Methods, 3rd Ed., Halsted, New York, 1974.

Tanase J., Tehnica chromatografica, aminoacizi, proteine, acizi nucleici. Ed. Technica, Bukurest, 1967.

Wilson C. L., Wilson D. W. (Edits.), Comprehensive Analytical Chemistry, Vol. IIB. Physical Separation Methods. Elsevier, Amsterdam, 1968.

Wolf F. J., Separation Methods in Organic Chemistry and Biochemistry. Academic Press, New York, 1969.

Zweig G. (Edit.), Handbook of Chromatography. Blackwell Sci. Publ., Oxford, 1972.

Zweig G., Sherma J. (Edits.), Handbook of Chromatography. Vol. I, C. R. C., Cleveland, USA, 1972.

Б. БУМАЖНАЯ И РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Блок Р., Лестранж Р., Цвейг Г., Бумажная хроматография, ИЛ, Москва, 1964.

Eschrich H., Drent W., Bibliography on Application of Reversed-Phase Partition Chromatography to Inorganic Chemistry and Analysis. European Co. Chem. Processing of Irradiated Fueles, Mol, Belgie, 1967.

Gasparič J., Churácek J., Laboratory Handbook of Paper-and Thin-Layer Chromatography. Ellis Horwood, Chichester, England, 1978.

Хайс И. М., Мацек К., Хроматография на бумаге. ИЛ, Москва, 1962.

Hais I. M., Macek K. (Edits.), Some General Problems of Paper Chromatography (Report of Symposium at Liblice, Czechoslovakia, 1961). NČSAV, Praha, 1962.

Linskens H. F., Strange L., Praktikum der Papierchromatographie. Springer-Verlag, Berlin, 1961.

Macek K., Hais L. M., Stationary Phase in Paper and Thin-Layer Chromatography. Elsevier, Amsterdam, 1965.

Macek K., Hais I. M., Gacparič K., Kopecký J., Rábek V., Bibliography of Paper Chromatography, III (1957—1960) and Survey of Applications. NCSAV, Praha, 1962.

Macek K., Hais I. M., Kopecký J., Gasparič J., Bibliography of Paper and Thin-Layer Chromatography 1961—1965. Elsevier, Amsterdam, 1968.

Macek K., Hais I. M., Kopecký J., Gasparič J., Rábek V., Churáček J., Bibliography of Paper and Thin-Layer Chromatography 1966—1969 and Survey of Applications. Vol. 2. Elsevier, Amsterdam, 1972.

Macek K., Hais I. M., Kopecký J., Schwarz V., Gasparič J., Churacek J., Bibliography of Paper and Thin-Layer Chromatography 1970—1973 and Survey of Applications. Elsevier, Amsterdam, 1976.

Nascutin T., Chromatografia pe hirtie a substantelor anorganice (Papirova chromatografie anorganických látek). Academici Republicii Romine, Bukurest, 1961.

Pollard F. H., McOmie J. F. W., Chromatographic Methods of Inorganic Analysis with special Reference to Paper Chromatography. Butterworths, London, 1953.

Sherma J., Zweig G., Bevenue A., Paper Chromatography and Electrophoresis. Vol. 2, Paper Chromatography. Academic Press, New York, 1971.

Smith I., Seakins J. W. T., Chromatographic and Electrophoretic Techniques. Vol. 1. Paper and Thin-Layer Chromatography, 4th Ed., Heinemann, London, 1976.

В. ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Bristow P. A., Liquid Chromatography in Practice. HETP, Handforth, England, 1976.

Brown P. R., High Pressure Liquid Chromatography. Biochemical and Biomedical Applications. Academie Press, New York, 1973.

Deyl Z., Kopecký J. (Edits.), Bibliography of Liquid Column Chromatography 1971—1973 and Survey of Applications. Elsevier, Amsterdam, 1976.

Жидкостная колоночная хроматография. Под ред. З. Дейла, К. Мацека, Я. Янака, т. 1—3, Мир, Москва, 1978.

Done J. N., Knox J. H., Loheac J., Applications of High-Speed Liquid Chromatography. J. Wiley-Interscience, New York, 1974.

Huber J. F. K. (Edit.), Instrumentation for High Performance Liquid Chromatography (J. Chromatogr. Library, Vol. 13). Elsevier, Amsterdam and New York, 1978.

Kirkland J. J., Chromatographie en phase liquide. Gauthier-Villars, Paris, 1973.

Kirkland J. J., Modern Practice of Liquid Chromatography, J. Wiley-Interscience, New York, 1971.

Lawrence J. F., Frei R. W., Chemical Derivatization in Liquid Chromatography. Elsevier, Amsterdam, 1976.

Liteanu C., Gocan S., Gradient Liquid Chromatography. Horwood, Chichester, 1974.

Liteanu C., Gocan S., Hodisan T., Nascu H., Chromatografia de Lichide Ed. Stiint., Bukurest, 1974.

Parris N. A., Instrumental Liquid Chromatographic Methods. Elsevier, Amsterdam, 1975.

Pourcel C., Chromatographie en Phase Liquide. CNSR, Paris, 1970.

Rajcsanyi P. M., Rajcsanyi E., High-Speed Liquid Chromatography. Vol. 6. M. Dekker, New York, 1975.

Rosset R., Caude M., Jardy A., Manuel pratique de chromatographie en phase liquide. Varian S. A., Orsay, France, 1975.

Scott R. P. W., Kucera P., Liquid Chromatography Detectors. Elsevier, Amsterdam, 1977.

Scott R. P. W., Techniques of Chemistry, Vol. II. Contemporary Liquid Chromatography. J. Wiley, New York, 1976.
Snyder R. L., Kirkland J. J., Introduction to Modern Liquid Chromatography. J. Wiley-Interscience, New York, 1974.

Г. АДСОРБЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Snyder K. R., Principles of Adsorption Chromatography; The Separation of Non-Ionic Organic Compounds (Chromatographic Science. Vol. 3.). M. Dekker, New York, 1968.
Арипов Е. А., Природные минеральные сорбенты, их активирование и модифицирование. ФАН, Ташкент, 1970.
Vamos E., Ipary adszorpcios kromatografia. Müszaki Könyvkiadó, Budapest, 1964.
Тюкавкина Н. А., Литвиненко В. И., Шостаковский Н. Ф., Хроматография на полиамидных сорбентах в органической химии. Наука, Новосибирск, 1973.

Д. ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Амфлет Ч. Неорганические иониты. «Мир», Москва, 1966.
Boross L., Lonserés kromatográfia a szevres es biokemiatan. (Iontove výmenna chromatografie v organicke chemii a biochemii) Müszaki Könyvkiado, Budapest, 1968.
Челищев Ю. П., Ионообменные свойства минералов. Наука, Москва, 1973.
Даванков А. В., Иониты (Новое в жизни, науке и технике), серия Химия, вып. 8, Знание, Москва, 1980.
Dorfner K., Ionenaustauschromatographie. Academie-Verlag, Berlin, 1963.
Dorfner K., Ionenaustauscher, Eigenschaften und Anwendungen. De Gruyter, Berlin, 1963.
Гельферих Ф., Иониты, ИЛ, Москва, 1962.
Hering R., Chelatbildende Ionenaustauscher. Academia-Verlag, Berlin, 1967.
Inczedy J., Analytical Applications of Ion Exchangers. Pergamon Press, New York, 1966.
Ionescu T. D., Schimbatori de ioni. Tipuri Schimbul ionic aplicatii. 2nd Ed., Tehnica, Bucurest, 1964.
Ермоленко Н. Ф., Комаров В. С., Ионный обмен и сорбция из растворов. Изд-во АН БССР, Минск, 1963.
Marcus A., Kertes A. S. Ion Exchange and Solvent Extraction of Metal Complexes. J. Wiley, New York, 1969.
Marhol M., Měniče iontu v chemii a radiochemii. Academia, Praha, 1976.
Marinsky J. A., Ion Exchange. M. Dekker, New York, 1969.
Ионный обмен и хроматография. Под ред. В. П. Мелешко. Изд-во Воронежского госуниверситета, Воронеж, 1971.
Ольшанова К. И., Потапова М. А., Копылова В. Д., Морозова Н. М., Руководство по ионообменной, распределительной и осадочной хроматографии. Химия, Москва, 1965.
Осборн Г., Синтетические ионообменники. «Мир», Москва, 1963.
Osborn G. H., Synthetic Ion Exchangers. 2nd Ed. Champan and Hall, London, 1961.
Peterson R., An Introduction to Ion Exchange. Heyden a. Son Ltd., London, Sadtler Research Laboratories, Philadelphia, 1970.
Peterson E. A., Cellulosic Ion Exchangers. Elsevier, Amsterdam, 1970.
Теория ионного обмена и хроматографии. Под ред. В. В. Рачинского. Наука, Москва, 1968.
Reuter H., Kunstharzionenaustauscher (Symposiumbericht). Akademia-Verlag, Berlin, 1970.

Риман В., Уолтон Г., Ионообменная хроматография в аналитической химии. Мир, Москва, 1973.
Рябчиков Д. И., Цитович И. К., Ионообменные смолы и их применение. Изд-во АН СССР, Москва, 1962.
Салдадзе К. М., Пашков А. С., Титов В. С., Ионообменные молекулярные соединения. Госхимиздат, Москва, 1960.
Ионный обмен и иониты. Под ред. Г. В. Самсонова, Н. И. Никитина. Наука, Ленинград, 1970.
Самсонов Г. В., Тростянская Е. Б., Елькин Г. Э., Ионный обмен. Сорбция органических веществ. Наука, Ленинград, 1969.
Самуэльсон О., Ионообменное разделение в аналитической химии. Химия, Москва, Ленинград, 1966.
Stamberg J., Rádl V., Ionexy. SNTL, Praha, 1962.
Walton H. F., Ion-Exchange Chromatography. Halsted Press, Stroubsburg, USA, 1976.
Зверева М. Н., Применение ионитов в аналитической химии. Изд-во Ленинградского отделения общества по распространению политических и научных знаний, Знание, Ленинград, 1963.

Е. СИТОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Bombaugh K. J., Maley L. E., Denenberg B. A., Gel Permeation Chromatography: New Applications and Techniques. (Dechema Monogr. 62; 1102). Waters Assoc., Framingham, Mass. USA, 1968.
Determann H., Gelchromatographie, Gelfiltration, Gelpermeation, Molekülsiebe. Springer-Verlag, Berlin, 1967.
Fischer L., An Introduction to Gel Chromatography. North-Holland Publ., Amsterdam, 1969.
Flodin P., Dextran Gells and Their Application in Gel-Filtration. Pharmacia A. B., Uppsala, 1962.
Johnson J. F., Porter R. S., Analytical Gel Permeation Chromatography. J. Wiley-Interscience, New York, 1968.
Kremmer T., Boros L., Gelkromatografia. Müszaki Könyvkiado, Budapest, 1974.
Uglea C. V., Chromatografia pe gel permeabil. Noi domenii de aplicare. Ed. Acad. Rep. Soc. Rom., Bukurest, 1976.
Детерман Г., Гель-хроматография. Мир, Москва, 1970.

Ж. АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Dunlap R. B. (Edit.), Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography. Plenum Press, New York, 1974.
Egly J.-M. (Edit.), Affinity Chromatography and Molecular Interactions. Inst. Nat. de la sante et de la recherche medic., Paris, 1979.
Hoffmann-Ostenhof et al. (Edits.), Affinity Chromatography. Pergamon Press, New York, 1978.
Jakoby W. B., Wilchek M. (Edits.), Affinity Technique. Methods in Enzymology. Vol. 34. Academic Press, New York, 1974.
Lowe C. R., An Introduction to Affinity Chromatography. North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1979.
Lowe C. R., Dean P. D. G., Affinity Chromatography, J. Wiley, New York, 1974.
Sundaram P. V., Eckstein F. (Edits.), Theory and Practice in Affinity Techniques. Academic Press, London, 1978.
Туркова Я., Аффинная хроматография. Мир, Москва, 1980.

З. ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Ахрем А. А., Кузнецова А. И. Тонкослойная хроматография. Наука, Москва, 1964.

Bobbitt J. M., Thin-Layer Chromatography. Reinhold, New York, 1963.

Geiss F., Die Parameter der Dünnschichtchromatographie; eine moderne Einführung in Grundlagen und Praxis. Monographie für das analytische Laboratorium und die Lehre. Vieweg. Brunswick, 1972.

Janchen D. (Edit.), Thin-Layer Chromatography. Cumulative Bibliography 1964—1968. Camag, Muttenz, 1967.

Lábler L., Schwarz V. (Edits.), Chromatografie na tenke vrstve. NČSAV, Praha, 1965.

Macek K. (Edit.), Pharmaceutical Application of Thin-Layer Chromatography. Elsevier, Amsterdam, 1972.

Marini-Bettolo G. B., Thin-Layer Chromatography. Elsevier, Amsterdam, 1964.

Nichols B. W., Thin and Spread Layer Chromatography. Van Nostrand, London.

Opienska-Blauth J., Kraczkowski H., Bruszkiewicz H., Zarys chromatografií cienkowartwowej. 2. vyd., Wyd. rolnicze lesne. Varsava, 1971.

Pelloni-Tamas V., Johan F., Cromatogafia in Strat Subtire. Tehnica, Bukurest, 1971.

Randerath K., Dünnschicht-Chromatographie, 2nd Ed., Verlag Chemie, Weinheim, 1965.

Smith I., Seakins J. W. T., Tenkovrstva chromatografie —

Truter E. V., Thin Film Chromatography, Cleaver-Hume, London, 1963.

Tyihak E. (Edit.), Retegkromatografia irtak, A biokémia módern modszerei, 1. Magy. Kémikusok Egyesélete, Budapest, 1965.

Высокоэффективная тонкослойная хроматография. Под ред. А. Златкиса и Р. Кайзера. Мир, Москва, 1979.

И. ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Ambrose D., Gas Chromatography, 2nd Ed., Butterworths, London, 1971.

Bayer E., Gas Chromatographie. 2nd Ed., Springer-Verlag, Berlin, 1962.

Байер Э., Хроматография газов. ИЛ, Москва, 1961.

Березкин В. Г., Алишоев В. Р., Немировская И. Б., Газовая хроматография в химии полимеров. Наука, Москва, 1972.

Березкин В. Г., Аналитическая реакционная газовая хроматография. Наука, Москва, 1966.

Brenner N., Gallen J. E., Weissnaugatuck M. D. (Edits.), Gas Chromatography (Symposium). Academic Press, New York, 1962.

Сторрс Э., Газовая хроматография в биохимии. Мир, Москва, 1961.

Buzon J., Guichard N., Guiochon G. et al., Manuel Practique de Chromatographie en Phase Gazense. Masson, Paris, 1964.

Ciola R., Introducao a Cromatografia em Fase Gasosa. Assoc. Brasieleira Quim., Curitiba, Brazilie, 1969.

Dabrio B. M. V., Farre R. F., Garcia D. J. A., Gassiot M. M., Martinez U. R., Chromatograpfia de Gases, Vol. 1. Alhambra, Madrid, 1971.

Dabrio M. V., Chromatografia de Gases, Vol. 2, Alhambra, Madrid, 1973.

Даль Ногаре С., Джувет Р. С., Газо-жидкостная хроматография. Недра, Москва, 1962.

Dimitrov Ch., Petsev N., Gazova Chromatografija. Nauka Izkustv., Sofia, 1974.

Ettre L. S., Zlatkis A. (Edits.), The Practice of Gas Chromatography. J. Wiley-Interscience, New York, 1967.

Ettre L. S., Open Tubular in Gas Chromatography. Plenum Press, New York, 1965.
Fowler L. (Edit.), Gas Chromatography (Symposium). Academic Press, New York, 1963.
Gasco L., Teoria y Practica de la Cromatografia en Fase Gaseose. Ediciones J. E. N., Madrid, 1969.
Goldup A. (Edit.), Gas Chromatography 1964. The Inst. of Petroleum, London, 1965.
Grant D. W., Gas-Liquid Chromatography. Van Nostrand, Reinhold, New York, 1971.
Gupta P. L., Mallik K. L., Gas Chromatography Manual. Indian Inst. of Petroleum, Dehra Dun, Indie, 1968.
Джеффери П., Киппинг П., Анализ газов методом газовой хроматографии. Мир, Москва, 1976.
Jentsch D., Gas Chromatographie. Grundlagen, Anwendungen, Methoden. 3nd Ed., Franckh., Stuttgart, 1975.
Jones R. A., An Introduction to Gas-Liquid Chromatography. Academic Press, New York, 1970.
Kaiser R., Gas-Chromatographie. 2nd Ed., Akademische Verlag-sgesellschaft, Berlin, 1962.
Kaiser R., Bibliographisches Institut Hochschultaschenbücher, Bd. 22. Chromatographie in der Gasphase, Bd. 1. Gaschromatographie, 2nd Ed., Bibl. Inst. Mannheim, 1973.
Киселев А. В., Яшин Я. И., Газо-адсорбционная хроматография. Наука, Москва, 1967.
Knox J. H., Gas Chromatography. J. Wiley, New York, 1962.
Коцев Н., Справочник по газовой хроматографии. Мир, Москва, 1976.
Krugers J. (Edit.), Instrumentation in Gas Chromatography. Centrex Publ. Corp., Findhoven, 1968.
Кулаков М. В., Шкатов Е. Ф., Ханберг В. А., Газовые хроматографы. Энергия, Москва, 1968.
Lavoue G., La chromatographie en phase gazeuse et ses applications. Maloine, Paris, 1976.
Руководство по газовой хроматографии. Под ред. Э. Лейбнитца и Х. Г. Штруппе. Мир, Москва, 1971.
Littlewood A. B. (Edit.), Gas Chromatography 1966. Inst. of Petroleum, London, 1967.
Газовая хроматография. Библ. указатель отечественной и зарубежной литературы. Составитель Е. М. Литвинова. Под ред. Е. Ф. Литвина. 1972, 1974, 1978.
Mattick L. R., Lectures on Gas Chromatography. Plenum Press, New York, 1967.
Miller J. M., Experimental Gas Chromatography. 2nd Ed., Gow-Mac Instrument Co., Madison, USA, 1965.
Новак И., Количественный анализ методом газовой хроматографии. Мир, Москва, 1978.
Paolacci A., Guida Alla Gas-Cromatografia. Assissi, Porziuncola, Italie, 1973.
Paryjczak T., Chromatografia gazowa w badaniach adsorpciji i katalizy. Panstv. wyd. nauk, Varsava, 1975.
Pattison J. B., A Programmed Introduction to Gas-Liquid Chromatography, 2nd Ed., Sadtler Res. Lab. Inc., Philadelphia, 1973.
Piringer O., Tataru E., Cromatografia in Faza Gazoasa. Technica, Bukurest, 1969.
Purnell J. H., Gas Chromatography. J. Wiley, New York, 1962.
Purnell H., New Developments in Gas Chromatography. (Advances in Analytical Chemistry, Vol. II). J. Wiley, New York, 1973.

Rowland F. W., The practice of Gas Chromatography. Hewlett Packard, Avondade, USA, 1973.

Газовая хроматография. вып. 13. Под ред. К. И. Сакодынского. НИИНефтехим, Москва, 1970.

Scorr R. P. W. (Edit.), Gas Chromatography. Butterworths, London, 1960.

Schröter M., Metzner K. (Edits.), Gas-Chromatographie, 1961 (Symposium). Akademie-Verlag, Berlin, 1962.

Signeur A. V., Guide to Gas Chromatography Literature, Vol. 3. Plenum Press, New York, 1974.

Sikorski Z. E., Chromatografia gazova. Wydawn. Naukowo-Techn., Varsava, 1962.

Simpson C. F., Gas Chromatography (Laboratory Instruments and Techniques Series). Kogan Page, London; Barnes and Noble, New York, 1970.

Staszewski R., Podstawovy kurs chromatografii gazowej. Zaklad narodowy im. Ossolinskich, Varsava, 1972.

Столяров Б. В., Савинов И. М., Витенберг А. Г., Руководство к практическим работам по газовой хроматографии. Изд-во Ленинградского университета, Ленинград, 1973.

Storch de Gracia J. M., Fundamentos de la Chromatografia de Gasas (Zaklady plynove chromatografie). Althambra, Madrid, 1975.

Swaay M. (Edit.), Gas Chromatography 1961 (Symposium). Butterworths, London, 1962.

Szepesy L., Gazkromatografia. Müszaki Könyvkiado, Budapest, 1963.

Szymansky H. A., Lectures on Gas Chromatography 1962. Plenum Press, New York, 1962.

Шингляр М., Газовая хроматография в практике. Химия, Москва, 1964.

Takayama Y., Gas Kuromatogurafi No Tehodoki, Nankodo, Tokyo, 1971.

Takeuchi T., Takayama Y., Nyumon Gas Kuromatogurafi. Nankodo, Tokyo, 1971.

Taramasso M., Gas Chromatografia. Angeli, Milan, 1968.

Tranchant J. (Edit.), Manual de Chromatographie en Phase Gazeuse, 2. ed. Masson, Paris, 1968.

Вигдергауз М. С., Измайлов Р. И., Применение газовой хроматографии для определения физико-химических свойств веществ. Наука, Москва, 1970.

Жуховицкий А. А., Туркельтауб Н. М., Газовая хроматография. Гостоптехиздат, Москва, 1962.

К. ЭКСТРАКЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Экстракционная хроматография. Под ред. Г. Брауна и Г. Герсини. Мир, Москва, 1978.

Hecker E., Verteilungsverfahren im Laboratorium. Verlag Chemie, Weinheim, 1955.

Л. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Arbuthnott J. P., Beeley J. A. (Edits.), Isoelectric Focussing. Butterworths, London, 1975.

Bier M. (Edit.), Electrophoresis, Vol. 2. Academic Press, New York, 1967.

Bloemendal H., Zone Electrophoresis in Block and Columns. Elsevier, Amsterdam, 1963.

Clotten R., Clotten A., Hochspannungselektrophorese. Thime-Verlag, Stuttgart, 1962.

Dittmer A. (Edit.), Papierelektrophorese. Grundlagen, Methodik, Klinik. Fischer, Jena, 1961.

Deyl Z., Kopecký J., Davidek J., Juricova M., Helm R., Bibliography of Electrophoresis 1968—1972. A Survey of Applications. Elsevier, Amsterdam, 1975.

Everaerts F. M., Beckers J. L., Verheggen Th. P. E. M., Isotachophoresis. Theory, Instrumentation and Applications. Elsevier, Amsterdam, 1976.
Grabar P., Burtin P., Immuno-Electrophoretic Analysis. Elsevier, New York, 1964.
Kiso Yoshiyuki, Kagaku no Ryoiki Sonshu. 3: Zon Denki Oyogido; Ionikusu no Ataraskii Kokoromi. Nankodo, Tokyo, 1972.
Lloyd P. H., Monographs on Physical Biochemistry: Optical Methods in Ultracentrifugation, Electrophoresis and Diffusion with a Guide to the Interpretation of Records. Oxford Univ. Press, Oxford, 1974.
Michalec C., Korinek J., Musil J., Rizicka J., Elektroforeza na papire a jinych nosicich, NČSAV, Praha, 1959.
Moody G. J., Thomas J. D. R., Practical Electrophoresis. Merrow, Watford, England, 1975.
Nerenberg S. T., Electrophoresis: A Practical Laboratory Manual, 2nd Ed., Blackwell, Oxford, 1972.
Nerenberg S. T., Medical Technology Series: Electrophoretic Screening Procedures. Lea and Febiger, Philadelphia, 1973.
Radola B. J., Graesslin (Edits.), Electrofocussing and Isotachophoresis. Walter de Gruyter, Berlin, 1977.
Righetti P. G. (Edit.), Progress in Isoelectric Focussing and Isotachophoresis. Proceedings of the Third International Symposium Held at the Department of Biochemistry, University of Milan (Italy), September 2—5, 1974. North-Holland, Amsterdam, 1975.
Sargenet J. R., George S. G., Methods in Zone Electrophoresis, 3nd Ed., British Drug House Chemicals, Poole, England, 1975.
Shaw D. J., Electrophoresis. Academic Press, New York, 1969.
Scheiffarth F., Berg G., Goetz H., Papierelektrophorese in Klinik und Praxis, B. H. Blackwell, Oxford, 1963.
Smith I., Seakins J. W. T., Chromatographic and Electrophoretic Techniques. Vol. II. Zone Electrophoresis, 4nd Ed., Heineman, London, 1976.
Vamos L., Electrophorese auf Papier und anderen Trägern. Akademie-Verlag, Berlin, 1972.
Whitaker J. R., Paper Chromatography and Electrophoresis. Vol. 1. Electrophoresis in Stabilizing Media. Academic Press, New York, 1967.
Wieme R. J., Agar Gel Electrophoresis. Elsevier, New York, 1965.
Wunderly Ch., Principles and Applications of Paper Electrophoresis. Elsevier, Amsterdam, 1961.

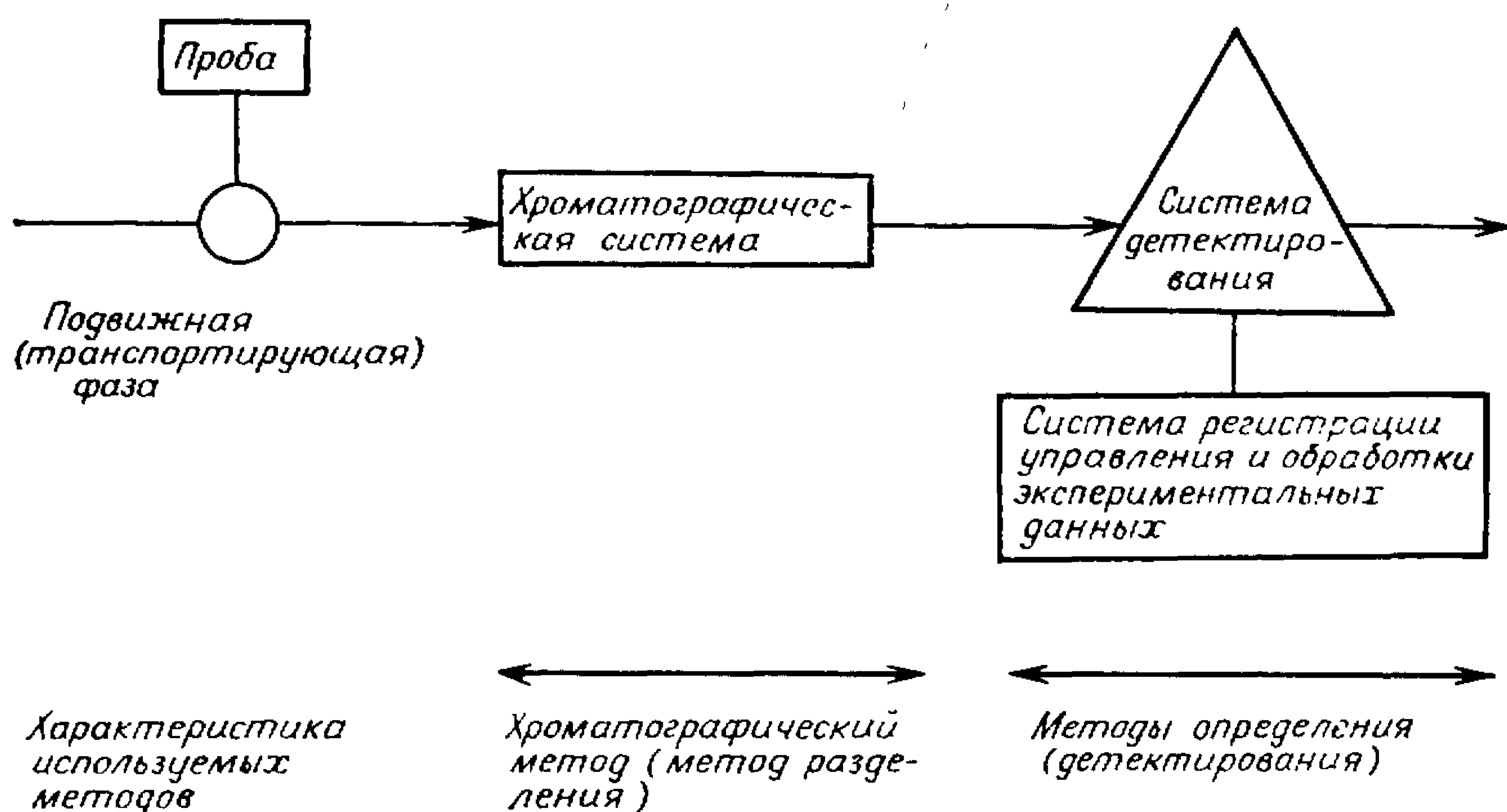
Послесловие редактора перевода

С точки зрения аналитика, все, что нас окружает, — воздух, вода, почва, минералы и т. д., — представляет собой многокомпонентную смесь соединений и элементов, поэтому одной из типичных задач исследователя является определение состава такой смеси. В настоящее время наиболее распространенными аналитическими методами можно считать газовую, жидкостную, колоночную и тонкослойную хроматографию. Несомненным признанием большого научного значения хроматографических методов явилось присуждение Нобелевской премии в 1948 г. А. Тизелиусу за исследование электрофореза и адсорбционного анализа (т. е. в области жидко-твердофазной хроматографии) и в 1956 г. — А. Мартину и Р. Синг за открытие распределительной хроматографии. Следует указать также, что хроматографические методы сыграли важную роль и в других исследованиях, отмеченных Нобелевской премией (см. таблицу).

В настоящее время с расширением круга анализируемых объектов и усложнением аналитических задач все более необходимыми становятся высокоселективные и высокочувствительные методы определения. Идеальным аналитическим методом был бы высокоселективный метод, позволяющий избирательно и с высокой чувствительностью выявлять все компоненты смеси. Однако, к сожалению, известные в настоящее время высокоселективные методы не относятся к числу универсальных; они применимы, как правило, для селективного определения только отдельных групп соединений или элементов, детектирование же соединений внутри одной группы, в частности органических соединений, обычно не является селективным. С целью увеличения селективности определения в аналитической практике очень широко пользуются комбинированными, или гибридными, методами, в которых сочетается несколько аналитических методик. Особую и, по-видимому, наиболее важную группу составляют хроматогибридные методы, в которых хроматографические методы анализа объединены с химическими или физическими. Анализ многокомпонентных смесей начинается с разделения их на отдельные компоненты (или группы), после чего проводится идентификация этих компонентов и определяется их содержание. Предварительное хроматографическое разделение смесей позволяет значительно увеличить селективность определения, проводимого с помощью любого, даже малоселективного детектора, поэтому хроматогибридные методы популярны в современной аналитической химии.

В этой связи становится очевидной актуальность книги под ред. О. Микеша, в которой рассматриваются хроматографические и смежные методы анализа.

Это лабораторное пособие, написанное группой авторов из ЧССР, занимающей ведущее место в разработке теории и практических применений хроматографических методов, фактически представляет собой небольшую энциклопедию по хроматографии, адресованную прежде всего начинающим хроматографистам. В ней достаточно подробно рассмотрены все основные хромато-



графические методы, что особенно важно для решения задач, в которых свойства анализируемых компонентов изменяются в очень широких пределах (например, при исследовании смесей газообразных и твердых соединений или соединений с молекулярной массой от 10^2 до 10^6 и т. д.); достаточно просто изложены теория методов и техника их осуществления; тщательно отобраны примеры и рационально составлены библиографические списки. По нашему мнению, должного отражения в книге не нашли лишь два направления — реакционная газовая хроматография и капиллярная хроматография*.

Мы надеемся, что перевод данной книги будет способствовать более широкому применению хроматографических методов в исследовательских работах и промышленности.

В. Березкин

* Эти хроматографические методы более подробно рассматриваются в перечисленных ниже книгах.

1. *Рогинский С. З., Яновский М. И., Берман А. Д.* Основы применения хроматографии в катализе. — М.: Наука, 1972.
2. *Березкин В. Г.* Химические методы в газовой хроматографии. — М.: Химия, 1980.
3. *Руденко Б. А.* Капиллярная хроматография. — М.: Наука, 1978.
4. *Дженнингс В.* Газовая хроматография на стеклянных капиллярных колонках: Пер. с англ. — М.: Мир, 1980.

Удостоенные Нобелевской премии исследования, в которых применение хроматографических методов сыграло важную роль*

Год	Область	Авторы	Тема
1937	Химия	П. Каррер	Химия каротиноидов, в частности витаминов А и В
1938	Химия	К. Кун	Химия каротиноидов и витаминов
1939	Химия	Л. Ружичка А. Бутенандт	Химия полиметиленов и высших терпенов, химия и выделение половых гормонов
1950	Физиология и медицина	Т. Рейхштейн Р. Хенч Е. Кендел	Химия и выделение адренокортикоидных гормонов
1951	Химия	Е. Мак-Миллан Г. Сиборг	Открытие трансурановых элементов
1955	Химия	В. Дю-Виньо	Работы по гипофизным гормонам и первые синтезы полипептидных гормонов
1958	Химия	Ф. Сэнгер	Структура инсулина
1961	Химия	М. Келвин	Установление химических реакций, протекающих при фотосинтезе
1970	Химия	Л. Лелуар	Открытие сахарных нуклеотидов и их роли в биосинтезе карбогидратов
1970	Физиология и медицина	Б. Катц У. фон Эйлер Дж. Аксельрод	Изучение медиаторных веществ при нервном синапсисе
1972	Химия	К. Анфинсен С. Мур В. Стейн	Исследования в области химической структуры рибонуклеазы
1972	Физиология и медицина	Р. Портер Г. Эдельман	Исследования по выяснению структуры антител

* По данным работы *Ettre L. S.*, in «High-Performance Liquid Chromatography», Vol. 1. Ed. Cs. Horwath. Academic Press, New York, 1980, p. 4.

Предметный указатель

Агар в электрофорезе 20
Агароза в аминной хроматографии 19, 405, 436, 437
в ионообменниках 223, 225, 235, 316
гели 352 и сл., 413, 698
производные 418—419
степень активации 415
Адсорбенты 22, 177 и сл.
кислые 182
неполярные 158, 586
основность 182
поверхностно-пористые 177
полистирольные 175 и сл.
полностью пористые 177
полярные 158, 586
свойства 153 и сл.
удельная поверхность 627
Адсорбционная способность 12, 22
Адсорбция 22, 77, 614
изотерма 556, 625
на матрице ионообменной смолы 25
на носителе 588
на поверхности раздела 23
теплота 626, 637
физическая 244, 294, 296
Азокрасители, разделение 168
Азофенилгликозид, выделение 438—439
Азулены, анализ 119
Аквапак в хроматографии 356
Аланин, идентификация 122
Алкалоиды, анализ 128, 543
взаимодействие с иодом 95
гидрофобные 130
разделение 88, 95, 538
Альбумин сывороточный, разделение 693
Альдегиды, разделение 109, 110
Альдогексозы 105
Альдопентозы 104, 105
Алюминия оксид в хроматографии 153, 165 и сл., 502
активность 167
виды 165, 502
кислый 169
нейтральный 168
структура 165
суспензии 502
Алюмосиликаты как иониты 229, 230
структура 229
Амберлит 176, 209
Амидовый черный в хроматографии 707, 748
Амилаза, разделение 718
Аминоацилаза, выделение 442
п-Аминобензойная кислота в хроматографии 104
Аминобензол в хроматографии 104
2-Аминобифенил в хроматографии 104
2-Амино-4,6-дихлор-*симм*-триазин 415, 417
β-Аминоизомасляная кислота, идентификация 311
ε-Аминокапроил-D-триптофана метиловый эфир 431
Аминокислоты, амфотерность 241
анализ 121, 305 и сл., 322, 412, 475, 543
ацетилированные 16, 461
относительная подвижность 543
разделение 88, 92, 95, 295, 516, 529, 735
электрофорез 731—733, 735
γ-Аминопропилтриэтоксисилан 429
Аминоспирты, анализ 133
п-Аминофенил-β-D-тиогалактопиранозид 408
Аминофенолы в хроматографии 104
Аминоэтилагароза в хроматографии 419
Амины, взаимодействие с иодом 95
разделение 295, 543
Аммония основание, разделение 295
Анализ адсорбционный 14, 16, 28
калориметрический 96, 98
спектральный 97, 98
хроматографический, автоматизация 480 и сл.
газов 611, 637 и сл.
качественный 596, 715
количественный 613 и сл., 715—716
следов 633
точность 573
чувствительность 311
Анасил в хроматографии 509
Анальцит 229
4-Андростендион-3,17, идентификация 119
Анилина бифталат в хроматографии 545
Анионообменники 225
емкость 246
обработка 269
получение 13
сильноосновные 283, 285, 290, 300
слабоосновные 251
Анионы, изотахофорез 710
комплексные 293
разделение 288, 534—5
Анисовый альдегид в хроматографии 118
Антибиотики, анализ 139 и сл., 322 и сл.
тетрациклиновые 140, 532—3
Антигены, адсорбция 439
Антидепрессанты, анализ 141
Антрахиноны, анализ 119, 482
Антрон в хроматографии 104
Аппликаторы 522
Аргинин, идентификация 122, 125, 737
Аскорбиновая кислота, восстановитель 105
выделение 139
идентификация 111, 122
Аспарагин, идентификация 306
Аспарагиназа 532
Аспидоспермин, анализ 130
Ауксины, разделение 132
Ацетилхолинэстераза, сорбция 411
Ацетофенон, перегруппировка 184
Аэрогели 341

Бактериостазы гелей 376
Бактериофаги, разделение 20
Белки, анализ 121, 244 и сл., 266, 275, 305, 316, 366, 374, 381, 385, 378—90, 411, 415
коагуляция 88

молекулярная масса 744
обнаружение 723
разделение 480, 530, 689, 707, 719—23
репрессорные 407
сывороточные 743
транспортные 407
связывание 428, 429
функции 317
электрофорез 740 и сл.
Бензидинацетат 104
трихлорацетат 104
Биобеде в хроматографии 356
Биогели в хроматографии 509
размеры частиц 352
сорта 352, 421
характеристики 344, 348, 352, 408, 413, 414
Биополимеры амфотерные 251
электрофорез 683
Биотин, идентификация 138
Бифлавониды, разделение 211—212
Борная кислота в хроматографии 105
Бромкрезоловый зеленый 111, 539
Бромтиоловый синий в хроматографии 539
Бромфеноловый красный 111
синий 105, 743
Бумага хроматографическая 59, 60, 142
ацетилирование 61
в электрофорезе 689
гидрофобизация 61
из стекловолокна 61
ионообменная 146

Валин, идентификация 122
Ванилин в хроматографии
Винколейкобластин, идентификация 538—539
Вирусы, разделение 20
Виолуровая кислота в хроматографии 144
Витамины, анализ 137 и сл., 218, 325, 482
гидрофильные 137
липофильные 137
Вода, деминерализация 283
очистка 13
Водород, ионы 13
Воски, разделение 88
Время удерживания 44, 46, 199, 556

Газ-носитель 22
источники 565
очистка 562
разбавление 53
β-Галактозидаза, выделение 408, 410
Галловая кислота, идентификация 111
Гаптены, связывание 20
Гексаметилсилазан 590
Гексиловый спирт, липофильность 100
Гексозоамины, разделение 109
Гексозы, липофильность 100
Гексурановые кислоты, разделение 104
Гели 347 и сл.
в электрофорезе 698 и сл., 745
выбор 366—367
гидрофильные 26
декстрановые 509
инфицирование 376
матрица 397
оксиалкилметакрилатные 352, 424—426
полиакриламидные 351, 421, 439, 509, 699, 701, 727, 744, 747
поливинилацетатные 360 и сл.
полистирольные 356, 338—339
полиэтиленгликолевые 360 и сл.
проницаемость 366
размеры частиц 349, 367
хранение 375
Гемоглобин, анализ 314
изотахофорез 748
Гестагены, разделение 533—534
Гетероауксин, идентификация 132
Гидразиды, анализ 133
Гидроксиламина гидрохлорид 106
Гидрофильность 100
Гистидин, идентификация 122, 126
Гликозиды каротиноидов 208
разделение 169, 208—209
сердечные, анализ 118
стероидные 119
фенольные, идентификация 117
Гликолевая кислота в хроматографии 728
Глицерин, связывание 425
Глицин, идентификация 122
Глутамин, идентификация 306
Глутаминовая кислота, идентификация 122
Глутаровый альдегид в хроматографии 424
Глутатион, идентификация 303
Глюкурониды, анализ 119
Гормоны, выделение 407
Градиент концентрации 280
Грамин, идентификация 132

Дегидроэпиандростерон, гидроксилирование 674
11-Дезоксикортикостерон, идентификация 119
Деионизация 13
Денситометрия 99
Десорбция 13
динамическая 627
избирательная 26, 244
кривая 625
на ионитах 279
Детекторы 152, 467 и сл., 562
весы *Мартина* 576—577
гелиевые 579
дифференциальные 570
емкостные 473
интегральные 570
неселективного действия 467
пламенно-ионизационные 473—4,577—8,608
по теплопроводности 573—574, 712
рефрактометрические 464
селективные 605 и сл., 635
спектрофотометрические 467, 610
с переменной длиной волны 199, 468
термометрические 473
УФ 216, 467, 470, 712
чувствительность 571, 634
электронного захвата 606
эффективность 474
1,6-Диаминогексан, связывание 421
о-Дианизидина фосфат 104
Диатомовые земли 589
Дигидрохальконы, идентификация 116
п-Диметиламинобензальдегид 544
N,N-Диметил-*п*-аминобензоазобензоаты, получение 102—103
Диметилсульфоксид в хроматографии 134
Диметил-*п*-фенилендиамина гидрохлорид 105
Диметилформамид в хроматографии 91
Диметилхлорсилан 590
3,5-Динитробензоаты, получение 101, 118
3,4-Динитробензойная кислота, восстановление 105

Динитрофенилгидразины в хроматографии 117
2,4-Динитрофенилгидразоны в хроматографии 110
Дипептиды, разделение 214
Дипнон, получение 184
Диссоциация аминокислот 241—242
  ионогенных веществ 672
  константы 241
  пептидов 241—241
  степень 241
Дисульфиды, идентификация 135
Дифениламина фосфат 104
2,4-Дифенилфуран 184
Диффузия
  вихревая 565
  внутрь пор 54, 154
  в твердой фазе 25, 280
  дробная 14
  коэффициент 50
  молекулярная 154
  потоки 42
  продольная 41, 45, 48, 562
2,3-Дихлор-5,6-дициан-1,4-бензохинон 116
2,6-Дихлорфенолиндофенол 139
Дициклогексилкарбодиимид в хроматографии 111
Диэлектрическая проницаемость растворителей 75

Закон *Генри*, отклонения 53
  Дарси 51
  Нернста 654—655
  Рауля, отклонения 54

Изолейцин, идентификация 122
Изомеры, разделение 303
Изотахофорез 20, 681, 710 и сл.
  капиллярный 718, 725
  препаративный 717
  приборы 713, 717, 725—727
Изотерма *Ленгмюра* 625—626
Изотиоцианаты, идентификация 135
11-Икозановая кислота, идентификация 113
Имидазолы, анализ 132
Иминокислоты, анализ 313
Иммоноглобулин
  выделение 411
  разделение 739
Иммунодиффузия белков 723
Иммуносорбенты 432—33, 441—442
Индикаторы на кислоты 111
Индолы, анализ 130 и сл.
  липофильные 132
Инозит, идентификация 139
Инсулин, выделение 411
Интеграторы 200, 474
  цифровые 475, 580
Ионообменники, 24, 50, 222, 245 и сл., 506 и сл.
  акриловые 233
  амфотерные 225, 230
  биполярные 225, 317, 320
  буферирование 270—2
  декстрановые 235
  жидкие 226
  крупнопористые 205, 238, 299
  набухаемость 249, 294
  неорганические 223 и сл., 287
  обменная емкость 246
  олеофильные 236
  органические 13, 223
  плотность 249
  полистирольные 232, 247
  приготовление 207, 236
  селективные 226, 236
  специфического действия 226
  степень сшивки 266
  стирол-дивинилбензольные 316
Ионообменные смолы 231 и сл., 252, 266, 508
  набухаемость 249
  плотность 249
Ионы амфотерные 241, 251, 244
  идентификация 142, 290 и сл.
  исключение 244
  металлов 290 и сл.
  многозарядные 293
  неорганические 282, 286, 728
  органические 294
  разделение 286, 728
  цвиттер 241
Ионный обмен 222, 239, 283, 294
  водорода 13
  в почве 236
  законы 13, 240
  на природных продуктах 13
  скорость 239

Камеры хроматографические 62
  электродные 709
Канкринит 229
Карбоксипептидаза, анализ 407
Каротиноиды, разделение 15, 96, 119, 170
Катехины, идентификация 116
Катионообменники 13, 162, 223, 283
  акриловые 234
  емкость 246, 300
  неорганические 244
  предварительная обработка 269
  слабокислотные 251
  сильнокислотные 283, 295, 298
  сульфокислотные 225
Катионы
  изотахофорез 710
  комплексные 142
  металлов 13
  подвижность 731
  разделение 286 и сл.
Керосин в хроматографии 91, 112, 119, 130, 134
Кетозы, хроматографирование 105
Кетоны, разделение 109—110
Кетостероиды, разделение 96
Кизельгур в хроматографии 535
Кислоты, гидрофильность 110
  идентификация 111, 112, 127, 296, 548
  липофильность 110
  образование хелатов 728—729
Краны золотниковые 448
  мембранные 448
  перистальтические 448—449
  поворотные 448
  сильфонные 448
  четырехпозиционные 448
  шестипозиционные 448, 464
Красители хроматографические 17, 18, 707
Крахмал, разделение 109
α-Кристаллин бычий, разделение 722—3
Колонки 273, 566, 591
  адсорбционные 639
  в гель-хроматографии 346, 363—364
  вертикальные 37
  гидродинамическое сопротивление 280, 465

гомогенность упаковки 562
емкость 177, 273 и сл.
заполнение 182, 190—191
капиллярные 315, 569, 592—593
классические 190
размеры 274, 282, 372, 377, 464
соединение 377
спиральные 570
стеклянные 569
с целлюлозой 147
типы 464 и сл.
упаковочные 569
центрифужные 246
Комплексы металлов 291, 292
Конденсация капиллярная 588
Конкавалин на агарозе 433
Константы
групповые 85
равновесия 55
распределения 17, 23, 52, 53, 654—656
электролитической диссоциации 12
Концентрационный профиль 44
Корасил 177
Кориноиды, разделение 209
Кортизон, анализ 117
Коэффициенты
активности 53, 54, 55
емкости 54
замедления 562
обогащения 635
поправочные 619
проницаемости 51
разделения 659
распределения 558
сжимаемости 52
Ксантаты, хроматографирование 102, 135
Ксерогели в хроматографии 341, 356
Кумарины, идентификация 113
Кумасси синий в хроматографии 707

β-Лактоглобулин, анализ 315
Лактоны, хроматографирование 105
Лауриновая кислота, идентификация 113
Лейкокристин, идентификация 538—539
Лейрозин, идентификация 538—539
Лейцин, идентификация 122
Лигнины, анализ 119, 510
Лизергиновая кислота 141
Лизин, идентификация 122, 737
Лимонная кислота в хроматографии 125, 731
Линолевая кислота, идентификация 113
Липиды
анализ 119, 159, 209
изомеры 159
разделение 88, 161, 169
Липоевая кислота, анализ 137, 139
Липопротеины, разделение 696
Липофильность 100, 101
ЛСД, хроматография 141

Магния оксид в хроматографии 153, 169—170, 196
поверхность 170
получение 169
силикат, в хроматографии 503
Маностат 562
Массоперенос межфазный 562
Мембраны
ацетилцеллюлозные 693—694
коммерческие 691
полупроницаемые 55
Метанол, липофильность 100
Метилальдопентозы, хроматографирование 104
Метионин, идентификация 122
Методы разделения 21, 22
биавтографии 13, 139
Ватанабэ — Морикавы 670
гель — 19, 339—40
дробного диализа 338
запаздывания ионов 27
исключения ионов 27
Крейга 656—661
Монте-Карло 99
О'Киффа 668
отпечатков пальцев 734
пенного анализа 23
противоточного распределения 18, 652
радиометрические 143
расчета хроматограмм 617 и сл.
абсолютной калибровки 619
внутреннего стандарта 620
стандартной добавки 621
триангуляции 617
ультрафильтрации 339
ультрацентрифугирования 339, 390
хелатометрии 290
электрофорез 679 и сл.
Миристиновая кислота, идентификация 113
Моносульфонаты, разделение 296
Морденит 229
Мочевина в хроматографии 104, 112
производные 133

Насосы 449 и сл.
возвратно-поступательные 451
перистальтические 451—452
пневматические 450
шприцевые 450
Натрийнитропруссид 544
Нафталинсульфокислоты, разделение 304
Нафтиламин в хроматографии 104
Нафтол в хроматографии 104
β-Нафтоловый оранжевый 173
Нафторезорцин в хроматографии 104, 544
Нефть, разделение 14
Никотинамид
идентификация 138
разделение 659
Нингидрин 107
реагент на аминокислоты 95, 125, 313, 543
на аминосахара 107
на амины 133, 543
п-Нитроанилин диазотированный 546
Нозеан 229
Носители жидкой фазы 587—589
амфолиты 718—720
диаметр частиц 588
модифицированные 590
Нуклеаза стафилококка 318, 408, 413, 439
Нуклеиновые кислоты
анализ 327, 366, 381, 384—386, 407, 482
связывание 428, 440
электрофорез 752
Нуклеотиды
анализ 127, 327 и сл.
никотинамидные 442
разделение 749
связывание 428, 440

Обессоливание 88
Овоингибитор 434

Овомукоид куриный 433—434
17-Оксикортикостерон, идентификация 119
8-Оксихинолин в хроматографии 125, 144—145
Олеиновая кислота, идентификация 113
Олефины, разделение 527
Олигонуклеотиды, электрофорез 751—752
Олигосахариды, разделение 109, 556
Олигостиролы, разделение 368
Орсин в хроматографии 104
Ошибки в хроматографических определениях 614 и сл.

Пантотеновая кислота, анализ 137, 138
Парафиновое масло в хроматографии 119, 137
Парафины, разделение 88
Партриджа смесь 117
Пенициллины, разделение 140, 566, 671
Пептиды
 амфотерность 241
 анализ 121, 125—126, 210, 305, 312, 366, 382, 387, 412, 481, 529, 689
 восстановление 677
 молекулярные массы 746
Перенос массы 43
Пигменты, анализ 119
Пиретрины, разделение 482
Пиридина производные, анализ 134
Пиридоксин, анализ 137, 138
Пирограммы 630
 полимеров 630, 633
 температурный интервал 632
Пиролиз
 продукты 629—632
Пирролы, анализ 132
Пластинки в ТСХ 486 и сл.
Поверхность удельная 628
Подложка микропористая 49
Полиамиды в хроматографии 171 и сл. 503
Полидекстран в хроматографии 223, 225, 506
Полинуклеотиды, связывание 428, 440
Полисахариды, анализ 322, 387
Политионаты, разделение 289
Полиэтилендиамины, разделение 303
Порагели в хроматографии 356
Порфирины, разделение 170, 210, 214
Прогрестерон, идентификация 119
Пролин, анализ 122, 312
Пропиленгликоли в хроматографии 91
Простагландины, разделение 119
Протеазы, выделение 442

Равновесие адсорбционное 626
 при экстракции 657
Радиоактивные изотопы, разделение 13, 281
Разделение хроматографическое
 автоматическое 453 и сл.
 аминокислот 58, 680
 в инертной атмосфере 402
 высокоэффективное 478
 групповое 381 и сл.
 изотопов 13
 каротиноидов 15
 катионов 61
 методы 11, 21, 23, 37, 55, 666 и сл.
 на гелях 26, 381 и сл.
 непрерывное 673 и сл.
 предварительное 181
 смесей 514
 стероидов 58
 тонкое 181
 эффективность 555, 568
Распределение компонентов 23
 константа 23, 39, 53, 654—656
 отношение масс 655
 периодическое противоточное 652, 656 и сл.
 противоточное 652
 равновесие 45
 уравнение 658
Растворители в хроматографии 71, 118—120, 123, 127, 140, 186
 липофильность 74, 78
 миксотропный ряд 74, 75
 полярность 72, 74, 77
 протонодонорные 78
 электронодонорные 78
Расширение зоны 48
Реагент
 Гиббса 115, 138
 Грота 102, 135
 Джаффе 116, 133
 Драгендорфа 95, 128, 139, 543
 иодно-азидный 135
 Карра — Прайса 117, 137
 Кедде 118
 Кенига 134
 Пауля 126
 Прохазки 132
 Сакагучи 125, 126, 133
 Сальковского 130
 Фомена — Дениса 115
 Циммермана 118, 548
 Эрлиха 130, 133, 140—141
Реакция
 Маршала 138
 Римини 128
Резерпин, анализ 130
Резорцин в хроматографии 104
Рехроматографирование 665
Рибонуклеиновые кислоты, разделение 332, 431
Рибофлавин, анализ 138
Родамин В 542

Самописцы хроматографические 580
Сапонины, анализ 118
Сахара, разделение 103, 108, 169, 171, 210, 482, 556, 595
Свинца тетраацетат в хроматографии 105
Связывание избирательное 27
Семикарбазиды, анализ 133
Серин
 идентификация 122
 разложение 121
Серотонин, анализ 130, 132
Сесквитерпены 118, 200—201
Сефадексы в хроматографии 148, 235, 317, 327, 348 и сл., 382, 491, 531
 емкость 343
 промывание 375
 состав 349
 характеристики 342
Сефароза в хроматографии 355, 408, 413, 419 и сл.
 устойчивость 416
Силикагель в хроматографии 16, 24, 61, 153, 160 и сл., 180, 190, 216, 360, 487, 497 и сл., 527, 698
 активность 162, 490
 кислотность 161
 марки 498
 макропористый 500

модификации 160
поверхность 190
пористость 160, 360
прокаливание 192
регенерация 165
структура 160
суспензии 499—500
фракционирование 163
Скатол, анализ 132
Содалит 229
Сорбент в ТСХ 487, и сл., 497
Сорбция
антибиотиков 323
внутри пор 299
избирательная 26
изотерма 45
ионообменная 242, 578—9
свободная энергия 52
условия 412 и сл.
Спирты, разделение 101, 298, 595
Стеариловый спирт, липофильность 100
Стекло пористое в хроматографии 361—362, 487
Стеарины, разделение 170, 215, 217
Стероиды
анализ 117 и сл.
липофильные 110
разделение 96, 169, 548
Стирагель в хроматографии 346
Стрептомицины
гидрофильность 140
разделение 140
Субтилизин 318
Сульфаты, идентификация 135
Сульфиды, идентификация 135
Сульфонамины, идентификация 141
Сульфоны, идентификация 135
Сферон в хроматографии 346, 352—353, 424—426

Теоретическая тарелка, модель 50
число 56, 190, 560, 565
Теория *Брунауера, Эммета, Теллера* 628
Термолизин, расщепление ферментов 318
Термостаты хроматографические 570
Терпены, анализ 117, 549
Тестостерон, идентификация 119
Тетразолевый синий в хроматографии 118, 549
Тетрамицин, идентификация 140
Тиамины, анализ 137—138, 326
Тиогидантоины, идентификация 135
Тиолы, идентификация 135
Тиомочевины, идентификация 135
Тионы, идентификация 135
Тирозин
идентификация 122, 126
разложение 121
связывание 431
Тироксин, связывание 433
Титрование потенциометрическое 248
п-Толуидина гидрохлорид в хроматографии 104
Токоферолы, идентификация 137, 538
Треонин
идентификация 122
разложение 121
Триглицериды, разделение 528—529
Триметилхлорсилан 590
Трипсин
анализ 405—406
ингибиторы 433—434, 442
на целлюлозе 440
расщепление ферментов 318
Триптомицин, идентификация 132
Триптофан
идентификация 126, 132
разложение 121
связывание 431
Тритерпены, разделение 96
Трифенилтетразолийхлорид в хроматографии 105

Уголь древесный в хроматографии 13, 153, 170
активный 170, 185, 586
графитированный 170
эффективность 170
Удерживание хроматографическое 45, 46, 556
время 46, 556—8, 598
индексы 601—602
объем 558, 597, 603
относительное 598—599
параметры 282
пиков, оценки 614
уравнение 46
Ультрагели в хроматографии 355, 357
Ультрамарин 229
Уравнение
Козини — Кармана 51
материального баланса 42
Навье — Стокса 51
неразрывности 51
Хендерсона — Хессельбаха 241

Фаза(ы) 22
в экстракции 653—654
неподвижная 23, 29, 39, 40
выбор 580 и сл.
липофильность 59, 61
полярность 584
химически связанная 217
подвижная
выбор 71,
газовая 554, 555, 562
жидкая 51
скорость 54
химический состав 54
чистота 71
Фельдшпатоиды 229
Фенилаланин
идентификация 122
связывание 431
м-Фенилендиамин в хроматографии 104
п-Фенилендиаминфталат в хроматографии 118
Фенолы, разделение 115, 296—298, 546, 643
Фенотиазины 141
Ферменты аминокислот
анализ 317 и сл., 407
выделение 409
иммобилизованные 432
ингибиторы 409
разделение 702
расщепление 318—319
связывание 427
Физиологические жидкости, анализ 306, 331
Флавониды
идентификация 115, 116
разделение 210—211
Флавонон, идентификация 213
Флорезил в хроматографии 169
Флуоресценция 94
витаминов К 137

индолов 132
кумаринов 115
рибофлавина 138
стероидов 117
флавонидов 115
Фожазит 229—230
Фолиевая кислота, идентификация 138
Формальдегид, конденсация с кислотами 13
Формамид в хроматографии 91, 94, 119, 129, 134
Фосфономицин, анализ 322
Фрактогели в хроматографии 360
Фракционирование изоэлектрическое 718—720
Фталиевая кислота 104

Халькон, идентификация 213
Химотрипсин
анализ 405—406
выделение 431 и сл.
ингибиторы 435
производные 418
расщепление ферментов 318
связывание 425—426
Хиноны
анализ 119, 171
разделение 533—536
Хлорамфеникол, идентификация 140
Хлороформ в хроматографии 16, 71, 72, 87
Холевая кислота, идентификация 117
Холин, идентификация 133, 138
Хроматографирование
восходящее 62, 364, 377
горизонтальное 64
двухмерное 62
Хроматография 15, 39, 45
адсорбционная 12, 22, 36, 59, 152 и сл., 322
аналитическая 37, 59
аффинная 12, 19, 22, 26, 36, 55, 317, 385, 405 и сл.
бумажная 12, 18, 34, 58, 79, 92, 327
количественная 98
препаративная 97
в инертной атмосфере 201
возвратная 636
высаливания 27, 224, 298, 381
высокого давления 153, 177, 189, 197, 216
высокоскоростная 158, 578
вытеснительная 16, 29, 243, 244, 275, 298
газо-адсорбционная 554
газовая 12, 18, 298, 553 и сл.
газо-жидкостная 18, 35, 54
газо-твердофазная 18, 35
гель- 19, 22, 26, 36, 54, 55, 322, 339, 446
восходящая 373 и сл.
гидрофобная 36
диагональная 124
жидко-жидкостная 12, 35, 36, 54, 445
жидко-твердофазная 35, 36, 189
ионообменная 12, 13, 19, 22, 24, 36, 59, 222 и сл., 296, 305, 317, 322, 327
капиллярная 34
колоночная 16, 34, 127, 349, 363, 453
сухая 34, 56, 148, 154, 195, 521, 524, 611, 660
круговая 34, 59, 64, 93, 144, 145
на клиновидных полосках 34
на крахмале 34
на серебросодержащих сорбентах 159
обращенно-фазная 24, 36, 59, 500
окислительно-восстановительная 27
плоскослойная 34, 56, 611
препаративная 37, 59, 190, 216, 513, 521
проявительная 16, 31, 39, 59, 243, 665
радиальная 34
распределительная 16, 17, 22, 23, 36, 58, 80, 89, 172, 625 и сл.
реакционная 28
рециркулярная 377—379
связывания в соли 27
солюбилизационная 27
тонкослойная 18, 34, 58, 117, 189, 327, 485 и сл., 515
фронтальная 243
центрифужная 34, 59, 94, 145
эксклюзионная 341
Хроматомасс-спектрометрия 611—13
Хроматоцентрифуга 34

Целлюлоза в хроматографии 18, 20, 24, 59, 47, 407, 427, 439—440, 503 и сл., 749
ацетилированная 505
ионообменная 61, 210, 223, 234, 251, 266, 272, 313, 316
микрокристаллическая 504
производные 234, 427
Цеолиты 229
Циклодекстрины, разделение 510
Цистеиновая кислота, идентификация 122
Цистеин, идентификация 303
Цистин, разделение 121, 433
Циркония фосфат 230

Шабазит 229

Щавелевая кислота в хроматографии 104, 728

ЭВМ в хроматографии 477
Экзотоксин 328—329
Экстракция
зон хроматограмм 96, 98
исчерпывающая 654
противоточная 18, 652 и сл.
селективная 87
Эландиновая кислота, идентификация 113
Электродиализ 88
Электролиты
Электролиты
носители 688
системы 689
электродные 688
электропроводность 688—689
Электромиграция 679 и сл.
Электрофорез 12, 20, 678 и сл.
аминокислот 88
высоковольтный 690—692, 732
гель 698, 700—701
дискретный 681, 700 и сл., 723, 727
зонный 681, 689—693, 701, 728, 735
на бумаге 100, 124, 689, 743
непрерывный 685, 688
низковольтный 743
приборы 629, 694, 727, 732
с подвижной границей 681
техника безопасности 727—728
тонкослойный 696
ячейка 685—686
Электрофоретическая подвижность 684, 691, 699, 701, 730, 736

Элюенты 193, 446, 510
- гидрофильные 89
- коррозионно-активные 446

Элюирование
- анионов 288
- аффинное 317
- бензолом 72
- восходящее 92, 93, 143, 492
- градиентное 16, 32, 196, 199—200, 243, 277, 279—280, 292, 453 и сл.
- двухмерное 516
- избирательное 27, 171
- методы 515
- многократное 93
- нисходящее 64, 92, 143, 492
- продолжительность 79
- простое 31, 578
- проточное 517, 525
- пятен 70, 78, 89, 94, 112
- скорость 279—280
- специфическое 317
- ступенчатое 32, 124, 578
- условия 412
- циклогексаном 72
- через гель 341 и сл.

Элюотропные ряды 185, 194, 511, 513
Энтропия конформационная 55
Эритроциты, выделение 383
Эстрогены, разделение 219
Этилацетат в хроматографии 71
Эупаверин, анализ 130

Яд кобры, анализ 319

СОДЕРЖАНИЕ

Глава 7. Аффинная хроматография. Я. ТУРКОВА 405
7.1. Введение 405
7.1.1. Выбор нерастворимого носителя 407
7.1.2. Выбор и связывание аффинного лиганда 409
7.1.3. Условия сорбции и элюирования 412
7.2. Нерастворимые носители для аффинной хроматографии . . . 413
7.2.1. Полидекстрановые носители и их производные 413
Обзор производных и их характеристика 413
Химия связывания 414
Устойчивость агарозных гелей и работа с ними 416
7.2.2. Методики связывания аффинанта с агарозой и ее модификациями 416
Связывание аффинного лиганда с сефарозой, активированной бромцианом 416
Триазиновый метод связывания аффинанта с агарозой . . . 417
Модифицированные производные агарозы 418
Промышленные реагенты — CNBr-активированная сефароза 4B, AH-сефароза 4B и CH-сефароза 4B 419
7.2.3. Полиакриламидный и оксиакрилметакрилатный гели . . 421
Полиакриламидные производные 421
Методы получения производных акриламидных гелей и присоединения к ним аффинных лигандов 422
Стабильность полиакриламидных гелей и их производных . . 424
Оксиалкилметакрилатные гели 424
7.2.4. Целлюлоза и ее производные 427
Химические реакции при связывании аффинных лигандов . . . 427
7.2.5. Другие носители 428
7.3. Промышленные аффинные лиганды, связанные с нерастворимым носителем 431
7.4. Применение 433
7.4.1. Аффинная хроматография на производных агарозы . . . 433
Выделение куриного овоингибитора методом аффинной хроматографии на сефарозе, связанной с химотрипсином 433
Выделение химотрипсина методом аффинной хроматографии на сефарозе, ковалентно связанной с метиловым эфиром ε-аминокапроил-D-триптофана 435
Дополнительные примеры применения агарозы и ее производных 438
7.4.2. Аффинная хроматография клеток на биогеле P-6 со связанным гаптеном 438
7.4.3. Аффинная хроматография на производных целлюлозы . . 439
Очистка антител с помощью иммуносорбентов, полученных с применением бромацетилцеллюлозы (BAC) 439
Обзор применения производных целлюлозы 440
Литература 442

Глава 8. Автоматизация работы колонок в жидкостной хроматографии. Б. МЕЛОУН . . . 445

8.1. Введение . . . 445
8.2. Резервуары для элюента и гидравлические соединения . . . 446
8.3. Краны и насосы . . . 448
8.3.1. Краны . . . 448
8.3.2. Насосы . . . 449
8.4. Системы программирования и формирования градиента . . . 453
8.4.1. Системы формирования градиента . . . 453
8.4.2. Полное программирование . . . 460
8.5. Аппаратура для ввода образца, шприцы и хроматографические колонки . . . 461
8.5.1. Системы ввода образца и шприцы . . . 461
8.5.2. Типы современных хроматографических колонок . . . 464
8.5.3. Упаковка хроматографических колонок . . . 466
8.6. Детекторы . . . 467
8.7. Регистрация и обработка результатов . . . 473
8.8. Расходомеры и коллекторы фракций . . . 478
8.9. Более сложные системы и примеры комплексной автоматизации 480
Список иностранных фирм, выпускающих хроматографы . . . 482
Литература . . . 483

Глава 9. Тонкослойная хроматография. О. МОТЛ, Л. НОВОТНЫЙ 485

9.1. Введение . . . 485
9.2. Аппаратура для ТСХ . . . 486
9.2.1. Пластинки, приспособления для нанесения сорбентов, способы приготовления тонких слоев . . . 486
9.2.2. Хроматографические камеры и камеры для опрыскивания . 492
9.3. Твердые фазы для ТСХ . . . 497
9.3.1. Силикагель . . . 497
9.3.2. Оксид алюминия . . . 502
9.3.3. Силикат магния . . . 503
9.3.4. Полиамиды . . . 503
9.3.5. Целлюлоза . . . 504
Ацетилированные целлюлозы . . . 505
9.3.6. Ионообменники . . . 506
9.3.7. Материалы для гель-хроматографии . . . 509
9.3.8. Другие сорбенты . . . 509
9.4. Элюенты для ТСХ . . . 510
9.5. Методика ТСХ . . . 512
9.5.1. Нанесение проб . . . 512
9.5.2. Выбор элюирующих систем и методы элюирования . . 513
Специальные методы элюирования . . . 515
9.5.3. Обнаружение . . . 517
Физические методы обнаружения . . . 517
Химические методы обнаружения . . . 518
Биологические методы обнаружения . . . 518
Комбинированные методы обнаружения . . . 518
9.6. Количественное определение . . . 519
9.7. Препаративная тонкослойная хроматография . . . 521
9.7.1. Приготовление слоев . . . 522
9.7.2. Нанесение проб . . . 523
9.7.3. Элюирование хроматограмм . . . 523
9.7.4. Обнаружение . . . 523
9.7.5. Выделение соединений . . . 524

9.7.6. Преимущества препаративной ТСХ 524
9.7.7. Сухая колоночная хроматография 524
Заполнение колонок 524
9.7.8. Перенос условий ТСХ на колоночную хроматографию . . 525
9.8. Примеры применения ТСХ 527
9.8.1. Разделение олефинов на силикагеле, пропитанном солями серебра 527
9.8.2. Разделение и количественный анализ триглицеридов пальмового масла 528
9.8.3. Одновременное разделение смеси шестнадцати аминокислот на пленках с ионообменным слоем 529
9.8.4. Определение молекулярной массы гель-хроматографией 530
9.8.5. Разделение антибиотиков типа тетрациклина 532
9.8.6. Разделение гестагенов 533
9.8.7. Разделение неорганических анионов на слоях оксида алюминия 534
9.8.8. Неразрушающее визуальное обнаружение изопреноидных хинонов после разделения методом обращенно-фазной ТСХ 535
9.8.9. Разделение моно- и олигосахаридов на тонких слоях целлюлозы 536
9.8.10. Разделение пенициллинов с очень близкими структурами методом распределительной ТСХ 536
9.8.11. Количественный анализ токоферолов 538
9.8.12. Разделение винкалейкобластина, лейкокристина, лейрозина и лейрозидина методом ТСХ 538
9.9. Основные обнаруживающие реагенты для БХ и ТСХ 539
А. Неспецифические обнаруживающие реагенты 539
Б. Групповые обнаруживающие реагенты 543
Спирты 543
Алкалоиды 543
Аминокислоты, алифатические и ароматические амины . . . 543
Сахара 544
Фенолы 546
Соединения фосфора 547
Гетероциклические соединения 547
Нитросоединения 547
Органические кислоты 548
Карбонильные соединения 548
Серусодержащие соединения 548
Стероиды 548
Терпены 549
Список иностранных фирм, выпускающих хроматографы . . 549
Литература 550

Глава 10. Газовая хроматография. Р. КОМЕРС, М. КРЕЙЧИ . . . 553

Список обозначений 553
10.1. Введение 554
10.1.1. Открытие газовой хроматографии 554
10.1.2. Основы теории газовой хроматографии 554
Основные соотношения, характеризующие удерживание . . 556
Размывание хроматографических зон 560
10.2. Приборы 565
10.2.1. Газ-носитель 567
10.2.2. Ввод образца 568
10.2.3. Хроматографические колонки 569
10.2.4. Термостат 570

10.2.5. Детекторы 570
Детектор по теплопроводности (катарометр) 573
Весы Мартина 576
Ионизационные детекторы 577
Пламенно-ионизационный детектор 578
Гелиевый детектор 579
10.2.6. Хроматографические самописцы 580
10.3. Предварительная подготовка 580
10.3.1. Неподвижная фаза 580
10.3.2. Твердые носители для неподвижной фазы 587
10.3.3. Приготовление колонок 591
10.3.4. Нанесение неподвижной жидкой фазы (НЖФ) на внутреннюю поверхность капиллярных колонок 592
10.3.5. Подготовка образца 594
10.4. Качественный анализ 596
10.4.1. Идентификация компонентов смеси по характеристикам удерживания 596
10.4.2. Относительное удерживание и индексы удерживания . . 601
10.4.3. Селективные детекторы 605
Электронно-захватный детектор 606
Пламенно-ионизационный детектор со щелочным металлом . 608
Другие селективные детекторы 610
10.4.4. Газохроматографический анализ в сочетании с масс-спектрометрическим и другие специальные методы 611
10.5. Количественный анализ 613
10.5.1. Возможные источники ошибок 613
10.5.2. Оценка хроматографических кривых 614
10.5.3. Определение не полностью разделенных пиков 617
10.5.4. Количественная оценка хроматограмм 618
10.6. Программирование температуры 622
10.6.1. Причины использования 622
10.6.2. Методики и применение 623
10.7. Другие примеры применения газовой хроматографии . . . 625
10.7.1. Измерение изотерм адсорбции 625
10.7.2. Определение теплоты адсорбции 626
10.7.3. Измерение удельной поверхности адсорбента 627
10.7.4. Хроматография продуктов пиролиза 629
Техника пиролиза 631
Факторы, влияющие на пиролиз 632
Основные области использования 633
10.7.5. Анализ следов методом газовой хроматографии . . . 633
Непосредственные методы 634
Обогатительные методы 635
10.8. Примеры использования 637
10.8.1. Анализ газов и некоторых соединений, играющих важную роль в окружающей среде 637
10.8.2. Анализы органических и биологически важных соединений 643
Литература 643

Глава 11. Противоточное распределение. З. ПРОХАЗКА 652

11.1. Введение 652
11.1.1. Экстракция в системах жидкость — жидкость 652
11.1.2. Принципы противоточного распределения 653
11.1.3. Константа распределения 654
11.2. Периодическое противоточное распределение (метод Крейга) . 656
11.2.1. Основная методика (методика Крейга) 656

11.2.2. Характеристики противоточного распределения . . . 657
11.2.3. Аппарат 661
11.3. Варианты методов противоточного распределения 663
11.3.1. Способ рехроматографирования 665
11.3.2. Способ однократного извлечения 665
11.3.3. «Жесткий» способ разделения 666
11.3.4. Метод двойного извлечения 666
11.3.5. Метод О'Киффа [7, 14] 668
11.3.6. Способ Ватанабэ — Морикавы [22] 670
11.4. Факторы, влияющие на противоточное распределение . . . 670
11.5. Аналитическое применение противоточного распределения . . 672
11.6. Препаративное применение метода 673
11.7. Непрерывные методы 673
11.8. Примеры методик противоточного распределения 674
11.8.1. Обогатительное выделение одного компонента из сложной реакционной смеси в аппарате с 20 пробирками . . . 674
11.8.2. Выделение чистого [2-О-метилтирозил]окситоцина (метилокситоцин фирмы SPOFA) с помощью полностью автоматизированного аппарата для противоточного распределения [10] 676
Литература 678

Глава 12. Электромиграционные методы. З. ПРУСИК 679

12.1. Введение 679
12.2. Электрофорез 683
12.2.1. Теория миграции ионов в условиях зонного электрофореза и электрофореза с подвижной границей 683
12.2.2. Непрерывный электрофорез в свободном потоке . . . 685
12.2.3. Зонный электрофорез на бумаге 689
12.2.4. Зонный электрофорез на ацетатцеллюлозной мембране . 693
Приборы для электрофореза на ацетатцеллюлозных мембранах 694
12.2.5. Тонкослойный электрофорез 696
12.2.6. Гель-электрофорез 698
12.2.7. Гель-электрофорез при градиенте концентрации полиакриламида (ПГЭ) 699
12.2.8. Дискретный электрофорез в полиакриламидном геле . . 700
Основы метода 700
Методика аналитического дискретного электрофореза в полиакриламидном геле 702
Обнаружение с помощью окрашивания полиакриламидного геля 707
Обесцвечивание геля после дискретного электрофореза в полиакриламидном геле 708
Методика обесцвечивания с помощью прибора конструкции Прусика 709
12.3. Изотахофорез 710
12.3.1. Теория миграции ионов в условиях изотахофореза . . . 710
12.3.2. Капиллярный изотахофорез 712
Качественный анализ 714
Количественный анализ 715
12.3.3. Препаративный изотахофорез 717
12.4. Изоэлектрическое фракционирование (фокусирование) . . 718
12.4.1. Теория изоэлектрического фракционирования 718
12.4.2. Изоэлектрическое фракционирование в жидкой среде . . 719
12.4.3. Изоэлектрическое фокусирование в полиакриламидном геле 723
12.5. Источник питания 724
12.6. Техника безопасности 727
12.7. Примеры применения электрофореза 728

12.7.1. Зонный электрофорез неорганических ионов в лигандных буферных растворах 728
12.7.2. Электрофорез аминокислот и пептидов 731
Аминокислотные и пептидные карты 734
Зонный электрофорез диметиламинонафтилсульфонильных (DNS) производных аминокислот 735
Разделение аминокислот методом капиллярного изотахофореза 737
12.7.3. Электрофорез белков 740
Электрофорез белков на бумаге 741
Определение молекулярной массы белков методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата . . 744
Определение молекулярной массы белков с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в линейном градиенте концентрации [90] 747
Препаративный изотахофорез гемоглобина человека . . . 748
12.7.4. Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот и их фрагментов 750
Двухмерное разделение нуклеотидов 751
Литература 753

Глава 13. Обзор литературы. О. МИКЕШ 756

13.1. Введение 756
13.2. Периодические издания 757
13.3. Монографии 757
А. Хроматография 757
Б. Бумажная и распределительная хроматография 759
В. Жидкостная хроматография 760
Г. Адсорбционная хроматография 761
Д. Ионообменная хроматография 761
Е. Ситовая хроматография 762
Ж. Аффинная хроматография 762
З. Тонкослойная хроматография 763
И. Газовая хроматография 763
К. Экстракционная хроматография 765
Л. Электрофорез 765
Послесловие редактора перевода 767
Предметный указатель 770